

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE PECTINAS DE  
TEJOCOTE Y SU FUNCIONALIDAD EN LA ESTABILIZACIÓN DE  
EMULSIONES ACEITE-EN-AGUA**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
**DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

**JUAN CARLOS CUEVAS BERNARDINO**

CoDirección

Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter

Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros

Febrero, 2017

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT con nivel de competencia internacional, referencia 001466.

Ciudad de México, México a 1 de Febrero de 2017

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad  
Iztapalapa aprobó la tesis

**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE PECTINAS DE TEJOCOTE Y SU  
FUNCIONALIDAD EN LA ESTABILIZACIÓN DE EMULSIONES ACEITE-EN-  
AGUA**

Que presentó:

Juan Carlos Cuevas Bernardino

**Comité Tutorial**

CoDirector: Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter.  
Universidad Autónoma Metropolitana

CoDirectora: Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros.  
Universidad Autónoma Chapingo

Asesor: Dra. Angélica Román Guerrero.  
Universidad Autónoma Metropolitana

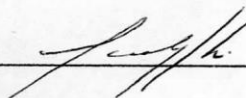
**Comité de evaluación:**

Presidente: Dra. Angélica Román Guerrero  
Universidad Autónoma Metropolitana



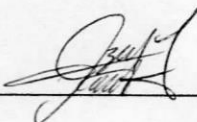
---

Secretario: Dra. Landy Hernández Rodríguez  
Universidad Autónoma Chapingo



---

Vocal: Dr. Jorge Gustavo Dzul Cauich  
Universidad de Guanajuato



---

Vocal: Dra. Blanca Hernández Rodríguez  
Universidad Autónoma Chapingo



---

## **Agradecimientos**

*Al Dr. Jaime Vernon Carter por su apoyo incondicional y grandes aportaciones para la culminación de este trabajo, mi respeto y admiración por el gran investigador que es usted.*

*A la Dra. Consuelo Lobato Calleros de esas personas únicas que no queda más que agradecer infinitamente por todas las cosas maravillosas que se aprenden al trabajar en su gran equipo de investigación, sin duda un placer recibir tan sabios consejos.*

*A la Dra. Angélica Román Guerrero por el gran apoyo brindado durante gran parte de la etapa experimental en la UAM, pero sobre todo muchas gracias por su confianza y amistad, otro gran logro obtenido.*

*A los miembros del jurado, Dra. Landy Hernández Rodríguez, Dr. Jorge G. Dzul Cauich y Dra. Blanca E. Hernández Rodríguez por su gran colaboración en la revisión del documento final.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento de este trabajo a través del proyecto 236500, así como también por el apoyo económico otorgado para la realización de los estudios de doctorado y además por la beca mixta asignada para la estancia internacional en los Estados Unidos.*

*A la Universidad Autónoma Metropolitana por darme la oportunidad de culminar mi última etapa de formación académica en su posgrado de Biotecnología de alto prestigio.*

*A la Universidad Autónoma Chapingo por todas las facilidades brindadas en su grandioso plantel, en especial al Dr. Raúl Nieto Ángel del Departamento de Fitotecnia por el material vegetal proporcionado y al Dr. Eleazar Aguirre Mandujano del Departamento de Preparatoria Agrícola.*

## Dedicatorias

*A mis papás, Josefina Bernardino y José Cuevas, gracias a ustedes por brindarme la oportunidad de volar y salir del nido familiar, por fin estamos viendo fructificado el esfuerzo hecho por todas las partes involucradas en este proyecto, se cierra un ciclo pero se abre otro.*

*A mis herman@s y sobrin@s que siempre me dan aliento allá en Guanajuato para seguir en este camino de la ciencia. Todos y cada uno de ustedes son el motor que me da ánimo de seguir pa' adelante, espero poder motivarlos a seguir superándose día a día.*

*A mi ahijado Dany, un pequeñín que conocí desde su nacimiento, sin duda grandes momentos que hemos pasado juntos.*

*A mi amigo Mario Terán Galeana, por todo lo que me ayudaste durante mi estancia en Estados Unidos, esos son los amigos que uno tiene que valorar en esta vida.*

*A todas las personas que de una u otra manera me apoyaron durante mi formación académica y personal, en especial al Dr. Eleazar, a mis compañeros del lab. Tecnología de Alimentos de la UACH, lab. W y R-003 de la UAM-I.*

## ÍNDICE GENERAL

|   |     |
|---|-----|
| <b>ÍNDICE GENERAL</b> .....                           | i   |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....                        | iii |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....                         | v   |
| <b>RESUMEN</b> .....                                  | vi  |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                 | vii |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....                          | 1   |
| <b>2. ANTECEDENTES</b> .....                          | 4   |
| 2.1. <i>Crataegus</i> spp.....                        | 4   |
| 2.2. Pectina.....                                     | 6   |
| 2.2.1 Métodos de extracción.....                      | 7   |
| 2.2.2. Características fisicoquímicas.....            | 8   |
| 2.3. Viscosidad intrínseca.....                       | 9   |
| 2.4. Tensión interfacial.....                         | 10  |
| 2.5. Emulsiones.....                                  | 11  |
| 2.5.1. Estabilidad de emulsiones con pectina.....     | 12  |
| <b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....                         | 15  |
| <b>4. HIPÓTESIS</b> .....                             | 16  |
| <b>5. OBJETIVOS</b> .....                             | 17  |
| 5.1. Objetivo general.....                            | 17  |
| 5.2. Objetivos particulares.....                      | 17  |
| <b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....                  | 18  |
| 6.1. Materiales.....                                  | 18  |
| 6.2. Extracción y purificación de la pectina.....     | 18  |
| 6.3. Caracterización fisicoquímica de la pectina..... | 19  |
| 6.3.1. Contenido de proteína total.....               | 19  |
| 6.3.2. Contenido de humedad.....                      | 20  |
| 6.3.3. Contenido de cenizas.....                      | 20  |
| 6.3.4. Contenido de ácido galacturónico.....          | 20  |
| 6.3.5. Contenido de fenoles totales.....              | 21  |

|   |           |
|---|-----------|
| 6.3.6. Grado de esterificación.....   | 21        |
| 6.3.7. Porcentaje de metoxilo .....   | 22        |
| 6.3.8. Peso molecular promedio .....  | 22        |
| 6.3.9. Viscosidad intrínseca y estimación de la conformación molecular..... | 23        |
| 6.4. Comportamiento de flujo de las soluciones de pectina .....             | 24        |
| 6.5. Tensión interfacial dinámica .....                                     | 25        |
| 6.6. Preparación y caracterización de emulsiones.....                       | 25        |
| 6.6.1. Preparación de emulsiones .....                                      | 25        |
| 6.6.2. Medición de viscosidad de corte .....                                | 26        |
| 6.6.3. Determinación del tamaño de gota promedio.....                       | 26        |
| 6.6.4. Potencial zeta .....   | 27        |
| 6.6.5. Estabilidad al cremado .....   | 27        |
| 6.7. Análisis de datos .....  | 27        |
| <b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>                                       | <b>28</b> |
| 7.1. Características fisicoquímicas de pectinas .....                       | 28        |
| 7.2. Reología de soluciones acuosas de pectina .....                        | 30        |
| 7.2.1. Viscosidad intrínseca.....   | 30        |
| 7.2.2. Comportamiento de flujo de soluciones de pectina.....                | 33        |
| 7.3. Dinámicas de adsorción .....   | 35        |
| 7.4. Caracterización de emulsiones .....                                    | 42        |
| <b>8. CONCLUSIONES.....</b>   | <b>51</b> |
| <b>9. REFERENCIAS .....</b>   | <b>52</b> |
| <b>10. ANEXO .....</b>  | <b>63</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Imágenes de flores y frutos de tejocote ( <i>Crataegus</i> spp.).  | 4  |
| Figura 2. Banco de germoplasma de tejocote de la Universidad Autónoma Chapingo.  | 5  |
| Figura 3. Esquema de los principales bloques que conforman la estructura de pectina de varias fuentes botánicas.   | 7  |
| Figura 4. Representación esquemática de un instrumento de gota pendiente usado para determinar la tensión interfacial.   | 11 |
| Figura 5. Representación esquemática de la adsorción de pectina en la interfase aceite-agua a diferente pH.  | 14 |
| Figura 6. Viscosidad reducida contra concentración de las pectinas: (a) PT50 y (b) PT55. La línea sólida muestra una relación lineal entre la viscosidad reducida y las concentraciones de pectina con NaCl 100 mM.  | 32 |
| Figura 7. Curvas de flujo de soluciones de pectina (1 % p/p) a pH 3.5 y 25 °C.   | 34 |
| Figura 8. Evolución con el tiempo de la tensión interfacial ( $\gamma$ ) para adsorción de pectina a pH 3.5 en función de la concentración (0.1, 0.5 y 1 % p/p) en la interfase aceite-agua. (a) PC; (b) PT55 y (c) PT50.  | 36 |
| Figura 9. La presión superficial ( $\pi$ ) contra la raíz cuadrada del tiempo ( $s^{0.5}$ ) para pectinas adsorbidas a pH 3.5 en la interfase aceite-agua, a una concentración de 0.1 % p/p. La línea sólida representa la pendiente de las curvas donde adsorción es controlada por difusión.   | 39 |
| Figura 10. Gráfica de $\ln(\pi_f - \pi_0 / \pi_i - \pi_0)$ contra el tiempo (s) para pectinas adsorbidas a pH 3.5 en la interfase aceite-agua, a una concentración de 0.1 % p/p. La línea sólida de la primera pendiente representa el coeficiente de penetración ( $K_1$ ) y la segunda pendiente representa el coeficiente de reacomodo estructural ( $K_2$ ). | 42 |
| Figura 11. Variación del tamaño de gota promedio de las emulsiones durante 28 días de almacenamiento a 4 °C: (a) PC; (b) PT55 y (c) PT50.  | 44 |
| Figura 12. Evolución de los perfiles de transmisión de las emulsiones estabilizadas con PC, PT55 y PT50 a diferentes concentraciones de pectina 0.5, 1 y 1.5 %.  | 47 |
| Figura 13. Transmisión integrada contra tiempo de las emulsiones estabilizadas con PC, PT55 y PT50 a concentración de 0.5 %.   | 48 |



Figura 14. Viscosidad aparente de las emulsiones aceite-en-agua con concentraciones de 0.5%, 1.0 % y 1.5 % de pectina de tejocote y cítrica a una tasa de corte calculada ( $50 \text{ s}^{-1}$ ).

49

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Rendimiento y características fisicoquímicas de pectinas purificadas extraídas de tejocote de dos diferentes accesiones comparadas a pectina cítrica. | 29 |
| Tabla 2. Parámetros dinámicos de adsorción de pectinas en la interfase aceite-agua.  | 40 |
| Tabla 3. Potencial zeta y velocidad de cremado de las emulsiones.  | 50 |

## RESUMEN

La pectina es un polisacárido ampliamente usado en la industria alimentaria y farmacéutica. La pectina de tejocote fue extraída y aislada usando dos diferentes accesiones (PT50 y PT55) para evaluar su potencial como una fuente vegetal para la producción de pectina comercial. En este trabajo, se observó que la pectina de tejocote tuvo mejores propiedades funcionales que la pectina cítrica comercial (PC). La pectina obtenida de PT50 y PT55 fue analizada y comparada con PC en términos de sus características fisicoquímicas, viscosidades intrínsecas, dinámicas de adsorción y propiedades emulsificantes. Los coeficientes  $a_{\text{MHKS}} = 0.71 \pm 0.02$  y  $k_{\text{MHKS}} = 5.08 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-4} \text{ g dL}^{-1}$  de Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada fueron obtenidos de datos de viscosidad intrínseca. Las constantes de difusión ( $K_{\text{dif}}$ ), penetración ( $K_1$ ) y reacomodo ( $K_2$ ) fueron determinados mediante dinámicas de adsorción de las pectinas en la interfase aceite-agua. El coeficiente  $K_{\text{dif}}$  fue mayor y  $K_1$  fue menor para PT50 respecto a los presentados por las otras dos pectinas (PT55 y PC). Estos resultados tuvieron relación con la estabilidad de emulsiones aceite-en-agua. Mayor  $K_{\text{dif}}$  produjo tamaños de gotas iniciales más pequeños, debido a una mayor rapidez de difusión de las moléculas a la interfase, mientras que menor  $K_1$  produjo estabilidad a largo plazo, ya que se formó una película interfacial más consolidada y más fuerte, haciendo más difícil la penetración de moléculas que llegan nuevamente a través de la monocapa. La tasa de cremado fue la más baja cuando el tamaño de gota fue el menor y la viscosidad aparente la mayor en las diferentes emulsiones. Los resultados de cinéticas de adsorción y de estabilidad de emulsiones aceite-en-agua indicaron que las pectinas de alto metoxilo de tejocote pueden ser consideradas eficientes agentes emulsificantes.

## ABSTRACT

Pectin is a polysaccharide that is widely used across food and pharmaceutical industries. Hawthorn pectin was extracted and isolated using two different accessions (HP50 and HP55) from hawthorn to assess its potential utilisation as a novel plant source of commercial pectin production. In this work, it was found that hawthorn pectin had better functional properties than commercial citrus pectin (CP). The pectin obtained from HP50 and HP55 was analysed and compared with CP in terms of physicochemical characteristics, intrinsic viscosity, adsorption dynamics and emulsifying properties. Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada coefficients,  $a_{\text{MHKS}} = 0.71 \pm 0.02$  and  $k_{\text{MHKS}} = 5.08 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-4} \text{ g dL}^{-1}$  were obtained from intrinsic viscosity data. The diffusion ( $K_{\text{diff}}$ ), penetration ( $K_1$ ) and the rearrangement ( $K_2$ ) constants were determined from adsorption dynamics data of the pectins at the canola oil-water interface.  $K_{\text{diff}}$  was higher and  $K_1$  was lower for HP50 than for HP55 and for CP. These results had bearing on the stability of oil-in-water emulsions. Higher  $K_{\text{diff}}$  produced smaller initial droplet sizes, due to the faster diffusion of molecules to the interface, while lower  $K_1$  produced longer-term stability, as a more consolidated and stronger interfacial film was formed faster, making arduous the penetration of newly arriving molecules through the monolayer. The rate of creaming was lower the smaller was the initial droplet size and the higher the apparent viscosity of the emulsions. The adsorption kinetic studies and the oil-in-water emulsions stability results indicated that the high methoxyl hawthorn pectins can be considered efficient emulsifying agents.

## 1. INTRODUCCIÓN

La pectina es usada en un gran número de alimentos como agente gelante, espesante, texturizante, emulsificante y estabilizador (Mesbani y col., 2005). La estructura molecular de la pectina está compuesta de poli- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-ácido galacturónico con grupos carboxilo en forma de metil éster (Jiang y col., 2012). Aunque, la pectina puede ser encontrada en algunos tejidos vegetales, su principal producción comercial se basa en manzana y cáscara de cítricos (Willats y col., 2006). Es recomendable explorar nuevas fuentes de pectina para buscar nuevas funcionalidades tecnológicas y para contribuir al desarrollo social y económico social de los productores locales. El tejocote (*Crataegus* spp.) es un género de árboles frutales o arbustos distribuidos en Norte América, Este de Asia, Asia Central y Europa, perteneciente a la familia Rosaceae, la cual contiene altas cantidades de pectina (Li y col., 2008; Uysal y col., 2014). En las últimas décadas, se ha puesto un mayor esfuerzo sobre la exploración de las propiedades de las pectinas de diferentes fuentes botánicas, ya que se ha incrementado la demanda del consumidor por los ingredientes alimenticios naturales y entre estos, los emulsificantes. Las propiedades funcionales de las pectinas dependen en gran medida de varios factores: peso molecular, grado de esterificación, grado de acetyl, fuente y método de extracción (Munarin y col., 2012; Schmidt y col., 2015). Por lo tanto, para establecer sus posibles aplicaciones, es necesario caracterizar sus propiedades fisicoquímicas. Para nuestro conocimiento, los trabajos sobre pectinas de tejocote se han limitado al estudio de sus características estructurales parciales y viscosidades de extractos en agua fría (Li y col., 2008); propiedades viscoelásticas y texturales de geles (Linares-García y col., 2015); la protopectina soluble y contenido de pectina de frutos de tejocote en diferentes estados de madurez (Li y col., 2015); la optimización del proceso de

extracción y algunas propiedades fisicoquímicas (Uysal y col., 2014). Sin embargo, no hay estudios respecto a la adsorción interfacial de pectinas de tejocote en la interfase aceite-agua, así como tampoco sobre su capacidad para estabilizar emulsiones aceite-en-agua. Cuando las pectinas, independientemente de su fuente, son destinadas para ser usadas en la estabilización de emulsiones, deberían establecerse varios criterios, si estas poseen actividad superficial, la capacidad para producir tamaños pequeños de gotas de aceite y estabilización de las emulsiones respecto a la floculación, coalescencia y separación gravitacional (Kermani y col., 2015). La aplicación de pectinas como emulsificantes es limitada debido al escaso conocimiento acerca de los fenómenos relacionados con características interfaciales (Perez y col., 2011). Se ha reportado que las pectinas de manzana y cítricas no son efectivas como agentes emulsificantes, independientemente de su grado de esterificación (Dickinson, 2003). Otros autores han reportado que la pectina cítrica, así como la de remolacha, estabilizan emulsiones aceite-en-agua, indicando que la pequeña cantidad de proteína asociada a la pectina juega un rol importante (Leroux y col., 2003). El material proteico se adsorbe en la interfase y las gotas de aceite son estabilizadas estéricamente por las fracciones de polisacáridos hidrofílicos que sobresalen dentro de la fase acuosa (Gülseren y col., 2014). Además, el grupo acetil dentro de la cadena de ácido galacturónico y los ésteres fenólicos en las cadenas laterales han mostrado que causan un efecto adicional de anclaje en la interfase (Fissore y col., 2013). La pectina cítrica depolimerizada con peso molecular de 70 000 Da y 70 % de grado de esterificación fue capaz de producir emulsiones estables de aceite de colza-en-agua. Solo una fracción (25 %) llegó a ser asociada con las gotas de aceite y esta contiene la mayoría de la fracción de proteína presente en el polisacárido (Akhtar y col., 2002). Como solo una pequeña fracción de las moléculas de pectina se adsorbe en la interfase, el resto de las moléculas de pectina aumenta la viscosidad de

la fase continua y disminuye la tendencia de las gotas de aceite dispersas de aproximarse unas con otras y coalescer (Kermani y col., 2015). La investigación acerca de las características interfaciales de pectinas, en nuestro caso de pectinas de tejocote, en términos de difusión, penetración y reacomodo configuracional de los segmentos adsorbidos en interfases aceite-agua y su relación con sus propiedades fisicoquímicas pueden proveer conocimiento útil para el diseño de emulsiones estables grado alimenticio. En este sentido, es importante comparar las propiedades de pectina de tejocote con aquellas de pectinas comerciales como pectina cítrica, incluso cuando sus características fisicoquímicas son obviamente diferentes, con el fin de evaluar su potencial tecnológico y comercial (Rubio-Senent y col., 2015). En este sentido, no hay investigaciones sistemáticas sobre la caracterización fisicoquímica de pectinas de diferentes accesiones de tejocote y la relación con la estabilidad de emulsiones.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. *Crataegus* spp.

El género *Crataegus* (Rosaceae: Maloideae) es distribuido en el hemisferio norte. En México hay una considerable biodiversidad con alrededor de 15 especies, la mayoría de ellas autóctonas, el nombre común es “tejocote”, derivado de la palabra Náhuatl “texocotl” que significa “fruto piedra” (Núñez-Colín y col., 2008, Nieto-Ángel y col., 2009). Los árboles de tejocote crecen como arbustos grandes o pequeños árboles y suelen estar armados con espinas, hojas brillantes de color verde oscuro, densos cúmulos de flores blancas, los frutos varían en color de amarillo a rojo (Figura 1) (Edwards y col., 2012).



**Fig. 1.** Imágenes de flores y frutos de tejocote (*Crataegus* spp.).

Casi 100 accesiones de *Crataegus* están resguardadas en el banco de germoplasma de tejocote en la Universidad Autónoma Chapingo (Figura 2), principalmente colectadas de tres estados de la República Mexicana: Puebla, Estado de México y Chiapas (Núñez-Colín y col., 2008, Nieto-Ángel y col., 2009).





**Fig. 2.** Banco de germoplasma de tejocote de la Universidad Autónoma Chapingo. Accesoión 55 (izquierda) y accesoión 50 (derecha).

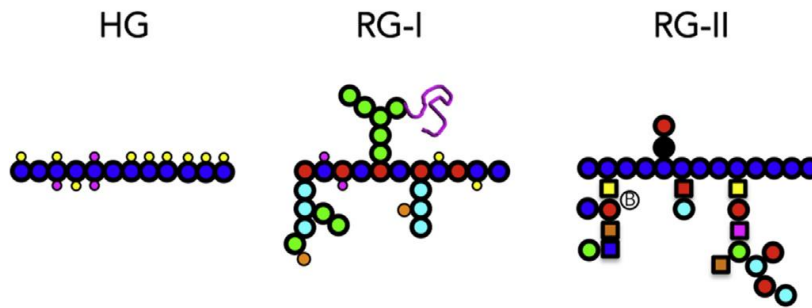
La mayoría de los estudios del género *Crataegus* se han enfocado principalmente en diferentes aplicaciones etnofarmacológicas por sus propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias, anti-tumorales (anti-cancerígenas), vasorelajantes, hipolipidémicas, anti-aterosclerosis, anti-coagulantes y neuroprotectoras usando diferentes extractos de hojas, flores y frutos de la planta (Song y col., 2011; Liu y col., 2011; Rodrigues y col., 2012; Zhang y col., 2013; Zhu y col., 2013; Li y col., 2015; Qiao y col., 2015; Chang y col., 2013).

El fruto de tejocote es utilizado para consumo humano en fresco por su alta calidad nutricional como una fuente natural, además de excelente sabor, atractivo color, contenido de compuestos fenólicos y anticancerígenos, lo cual puede proveer óptimos beneficios como alimento funcional

y nutracéutico (Gundogdu y col., 2014, Li y col., 2015; Mraihi y col., 2015; Liu y col., 2016). El fruto de tejocote procesado es ampliamente consumido en forma de jugo, ates, bebidas y fruta enlatada; y en la industria alimentaria es utilizado como fuente de pectina, vitamina C y otros componentes dietéticos, además está fuertemente ligado a la cultura mexicana (Li y col., 2015; Uysal y Yildirim, 2014; Linares-García y col., 2015; Nieto-Ángel y col., 2009). Sin embargo, el potencial del cultivo de tejocote en México no ha sido completamente explotado, el fruto de tejocote puede ser una fuente alternativa y novedosa de pectina. Hay pocos estudios sobre la extracción y caracterización de pectina de tejocote (Vivar-Vera et al., 2007; Li y col., 2008; Uysal y Yildirim, 2014) sin embargo, la información sobre la funcionalidad es todavía muy limitada.

## **2.2. Pectina**

La pectina, una clase compleja de heteropolisacáridos vegetales encontrada en la pared celular vegetal, está compuesta por una cadena principal conformada por unidades de ácido D-galacturónico las cuales pueden estar metiladas en el grupo carboxil en la posición 6, unidas por enlaces glicosídicos  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  4) y cadenas laterales de azúcares neutros (Denman y Morris, 2015; Zhang y col., 2015; Alba y Kontogiorgos, 2016). La estructura varía mucho debido al estado de madurez de la planta, la fuente botánica y los métodos de extracción aplicados, pero puede clasificarse en tres tipos según sus características comunes (Figura 3): homogalacturonano (HG), rhamnogalacturonano I (RG-I) y rhamnogalacturonano II (RG-II).



**Fig. 3.** Esquema de los principales bloques que conforman la estructura de pectina de varias fuentes botánicas. (Tomado de Alba y Kontogiorgos, 2016).

La identificación de la estructura molecular de la pectina es de importancia fundamental porque sus propiedades fisicoquímicas y funcionales (formación de gel y capacidad emulsificante) son altamente dependientes de su estructura (Ciu y Chang, 2014). La cáscara de cítricos y las manzanas son los materiales vegetales más usados para la producción y comercialización de pectina. Otras fuentes de pectina, incluyendo *Passiflora edulis f. flavicarpa* (Seixas y col., 2014), pectina extraída enzimáticamente de *Cucurbita mixta* (Cui y Chang, 2014), *Cucumis melo* Inodorus (Denman y Morris, 2015), *Mangifera indica* L. (Kermani y col., 2015), *Abelmoschus esculentus* L. (Chen y col., 2014; Alba y col., 2016), *Carica papaya* L. (Koubala y col., 2014; Maran y Prakash, 2015) se han sido considerado recientemente como posibles y potenciales fuentes alternativas de pectina.

### 2.2.1 Métodos de extracción

La extracción de pectina es un proceso fisicoquímico de múltiples etapas, lo cual involucra hidrólisis y extracción de macromoléculas de pectina de los tejidos vegetales, purificación del

extracto líquido y aislamiento de la pectina extraída del líquido, dichos procesos son influenciados por varios factores, principalmente temperatura, pH y tiempo de extracción (Seixas y col., 2014). Comercialmente, la pectina es extraída por tratamiento del material vegetal con ácido mineral a temperaturas elevadas y pH cercano a 2.0 y la pectina soluble es separada mediante precipitación con etanol (Sundar Raj y col., 2012). El contenido de ácido galacturónico de pectinas grado alimenticio debería no ser menor de 65 % acorde a la regulación de EU No. 231/2012, 2012 (Grassino y col., 2016). Hay otras técnicas para extracción de pectina, entre ellas se encuentran: Extracción con enzimas, extracción con agua caliente a presión elevada, extracción con microondas y extracción con ultrasonido (Yuliarti y col., 2015; Freitas de Oliveira y col., 2016; Adetunji y col., 2017). Las condiciones de extracción juegan un papel importante en el rendimiento, composición química y propiedades reológicas de las pectinas, el uso de ácido cítrico es justificado por aspectos ecológicos, el cual es amigable con el ambiente y aceptado como aditivo alimenticio (Mierczynska y col., 2017).

### **2.2.2. Características fisicoquímicas**

La relación de las unidades de ácido carboxílico esterificado con respecto al total de todas las unidades de ácido carboxílico en la cadena de pectina, indica el grado de esterificación (GE), dependiendo de esta característica fisicoquímica, la pectina se divide con fines comerciales en dos grupos: Pectina de alto metoxilo con GE mayor que 50 % y pectina de bajo metoxilo con GE menor que 50 % (Seixas y col., 2014). La propiedad fisicoquímica principal de la pectina es la habilidad de formar gel, la fuerza del gel está relacionada con el incremento del peso molecular, dependiendo del grado de esterificación la gelación ocurre bajo dos diferentes mecanismos (Kermani y col., 2015). Las pectinas de alto y bajo metoxilo pueden favorecer la

gelación, pero los mecanismos son diferentes, las pectinas de alto metoxilo forman geles en presencia de altas concentraciones de sacarosa (65 %) y bajo pH ( $\leq 3.5$ ), dicha gelación es atribuida a la formación de puentes de hidrogeno e interacciones hidrofóbicas mientras que las pectinas de bajo metoxilo forman geles vía interacciones electrostáticas en presencia de calcio y valores de pH cercanos a la neutralidad (Fishman y col., 2015).

### **2.3. Viscosidad intrínseca**

Una característica sobresaliente de las macromoléculas, es el aumento de la viscosidad cuando son disueltas en soluciones acuosas en pequeñas cantidades, este efecto es producido por la viscosidad intrínseca, extensamente usada para el análisis o caracterización de diversos hidrocoloides (Mohammad Amini y Razavi, 2012). La viscosidad intrínseca permite calcular el peso molecular promedio viscosimétrico usando la ecuación de Mark-Houwink, las diferentes constantes utilizadas dependen en gran medida de las condiciones de preparación, así como de la temperatura, pH y fuerza iónica. Por lo tanto, la viscosidad intrínseca es un parámetro molecular que indica el volumen hidrodinámico ocupado por la unidad de masa de macromolécula y depende principalmente del tamaño molecular, conformación y peso así como al solvente utilizado (Chen y col., 2009; Liang y col., 2015; Sousa y col., 2015). Migliori y col. (2010) analizaron soluciones acuosas diluidas de pectinas para determinar su peso molecular promedio, en sistemas binarios y ternarios con diferente grado esterificación.

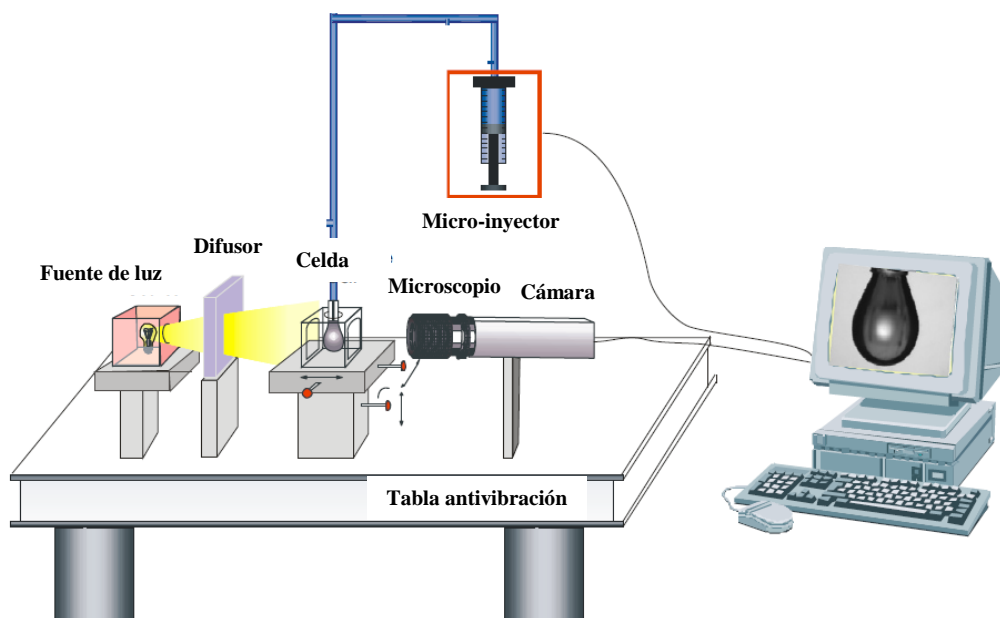
Interacciones de atracción o repulsión entre segmentos de la cadena del biopolímero afectan la hidratación del polisacárido soluble y por consecuencia al volumen hidrodinámico molecular, ya que el volumen molecular está relacionado a la conformación de la cadena de las moléculas del polisacárido en la solución, para polisacáridos específicos esta interacción puede

modificarse en función de las propiedades del solvente o la repulsión electrostática entre los segmentos de la cadena debido a la adición de cosolutos como azúcares o sales (Behrouzian y col., 2014; Mohammad Amini y Razavi, 2012).

#### **2.4. Tensión interfacial**

Las propiedades dinámicas superficiales de los emulsificantes en interfases fluidas son de gran importancia para formulaciones alimenticias coloidales. La tasa de adsorción de las proteínas en la interfase aire-agua y aceite-agua se considera muy importante en la formación y estabilización de espumas y emulsiones (Perez y col., 2010). El comprender estas interacciones es de gran importancia en una gran variedad de aplicaciones técnicas, especialmente en la formulación de sistemas coloidales que están conformados por un gran número de interfases (Pérez-Orozco y col., 2004). En el caso de sistemas coloidales el conocimiento reológico interfacial es indispensable para entender el comportamiento hidrodinámico del seno e interfase del sistema. Hay dos escenarios bien diferenciados donde la reología del seno e interfacial necesariamente interaccionan (Wulff-Pérez y col., 2011). La reología dilatacional y la tensión interfacial son herramientas sensibles que proveen información de la adsorción e interacciones intermoleculares sobre la estructura interfacial. La tensión interfacial es la energía libre por unidad de área superficial que es requerida para crear una interfase entre dos fases líquidas (Andersson y col., 2014). La aplicación de un modelo reocinético para estudiar mezclas biopoliméricas puede proveer información novedosa para entender las interacciones moleculares que ocurren en las capas interfaciales formadas por diferentes biopolímeros (Torcello-Gómez y col., 2012). Cuando una sustancia de actividad superficial es adicionada en agua, esta espontáneamente se adsorbe en la superficie y disminuye la energía superficial,

generando una efectiva repulsión entre las interfases de las gotas y por lo tanto previene la coalescencia de ellas (Langevin, 2000; Foudazi y col., 2015). Varias metodologías han sido desarrolladas para medir la tensión interfacial entre líquidos, la más comúnmente utilizada es la técnica de la gota pendiente (Figura 4), en este método una gota es formada al final de un tubo capilar donde son calculados la tensión interfacial, el área superficial y el volumen de la gota (Saad y Neumann, 2016).



**Fig. 4.** Representación esquemática de un instrumento de gota pendiente usado para determinar la tensión interfacial. (Tomado de Maldonado-Valderrama y col., 2015).

## 2.5. Emulsiones

Las emulsiones aceite-en-agua son una parte integral de algunos productos comerciales usados en las industrias de alimentos, suplementos, cuidado personal, cosméticos, detergentes y

farmacéuticos. Estas emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables que consisten de pequeñas gotas de aceite dispersas dentro de un medio acuoso (McClements y Gumus, 2016).

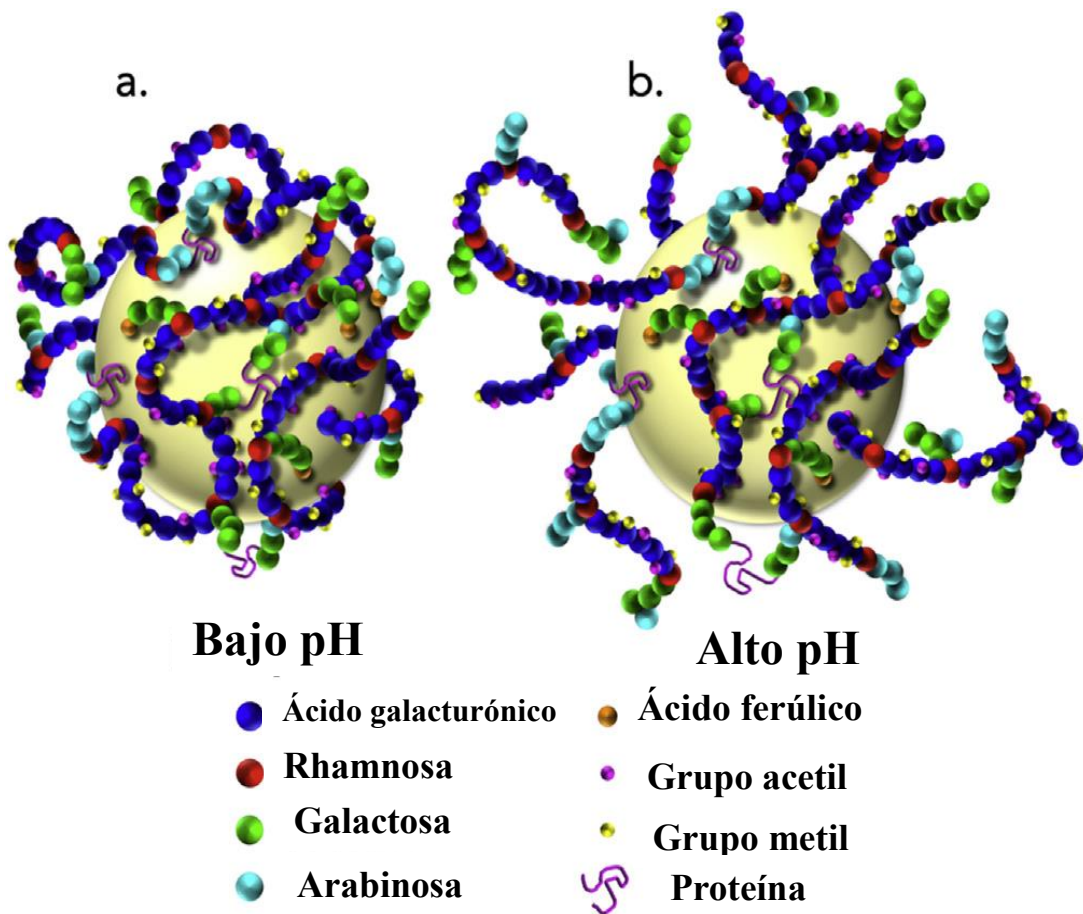
### **2.5.1. Estabilidad de emulsiones con pectina**

La función del emulsificante en la formación de la emulsión puede ser entendida al examinar los eventos fisicoquímicos más importantes que ocurren dentro de un homogenizador. Un emulsificante conlleva a la producción de gotas finas dentro del homogenizador debido a la absorción rápida a las superficies de las gotas disminuyendo la tensión interfacial lo más rápido posible (McClements y Gumus, 2016). Algunos polisacáridos naturales tienen buenas propiedades emulsificantes porque tienen grupos no polares o proteínas ligadas a sus cadenas de carbohidratos hidrofílicos (Ozturk y McClements, 2016). Las propiedades emulsificantes de pectinas han sido poco demostradas en la literatura (Cui y Chang, 2014; Kermani y col., 2015; Schmidt y col., 2015; Alba y col., 2016), un pequeño porcentaje de proteína hidrofóbica en pectinas juega un papel importante en la estabilización de emulsiones aceite-en-agua, también es notado que la pectina puede disminuir eficientemente la tensión interfacial entre el aceite y el agua en las emulsiones (Cui y Chang, 2014), la formación de capas interfaciales indican la adsorción de pectinas en la interfase aceite-agua, lo que favorece la estabilidad de emulsiones a tiempos largos de almacenamiento, esto puede ser atribuido a la formación de interfaces mecánicamente más fuertes y volumen hidrodinámico bajo de cadenas de pectinas, lo que resulta en estabilización estérica efectiva, mientras que el contenido de grupos metil y acetil no contribuyen a la estabilidad a largo tiempo (Alba y col., 2016). Los agentes emulsificantes más usados de naturaleza polisacárida en aplicaciones alimenticias son la goma arábiga, almidones modificados, celulosas modificadas y algunas pectinas, la estabilidad de emulsiones con



polisacáridos puede ser parcialmente asociada con el incremento de la viscosidad de los sistemas (Kermani y col., 2015). Usando pectina en ingeniería de diseño de interfase aceite-agua podría ser favorable, ya que dicho polisacárido es resistente a digestión enzimática en la boca y estómago, mientras que en colón, dicho polisacárido es digerido por pectinasas (Alba y col., 2016). La actividad interfacial de pectina y su habilidad para estabilizar emulsiones son atribuidas a componentes como: peso molecular, contenido de grupos metil y acetil, grado de ramificación, presencia de grupos ferúlicos y fracciones de proteína, presentes en toda la estructura del biopolímero (Figura 5), la arquitectura molecular de la pectina sobre la capacidad emulsificante ha mostrado que la pectina exhibe actividad interfacial y estabiliza emulsiones aceite-agua debido a la formación de capas de polisacáridos, lo cual conlleva a una adecuada repulsión estérica, lo que previene el crecimiento de la gota (Alba y Kontogiorgos, 2016).

Cuando el pH de la fase continua se encuentra por debajo del  $pK_a$  del ácido galacturónico, la protonación del anión carboxilato resulta en una conformación compacta de las cadenas de la pectina, dicha conformación hace que se aproximen los grupos hidrofóbicos a la fase de aceite y se adsorban en la interfase resultando en una adecuada estabilización estérica (Figura 5a), a valores de pH altos, la conformación de la pectina es extendida debido a la repulsión electrostática entre los residuos de ácido galacturónico y pocos grupos hidrofóbicos son capaces de anclarse en la interfase aceite-agua, lo que genera una mayor exposición de la gota de aceite a la coalescencia (Figura 5b).



**Fig. 5.** Representación esquemática de la adsorción de pectina en la interfase aceite-agua a diferente pH. (Tomado de Alba y Kontogiorgos, 2016).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad, se requiere de un conocimiento profundo sobre las interacciones interfaciales de los diversos biopolímeros empleados en la industria alimentaria, con la finalidad de diseñar adecuadamente la formulación y método de preparación de diversos sistemas dispersos alimenticios, tales como emulsiones. Estos sistemas pueden ser posteriormente usados para el desarrollo exitoso de nuevos productos más saludables. La aplicación de pectinas en la industria alimentaria se basa en sus propiedades gelantes, espesantes y estabilizantes. Se han desarrollado escasos estudios sobre la extracción y la caracterización fisicoquímica de pectina de tejocote y no existen estudios sobre su funcionalidad para estabilizar emulsiones y en consecuencia, tampoco sobre la relación entre esta última y sus propiedades fisicoquímicas. La generación de conocimientos relativos a esta área permitirá la aplicación exitosa de la pectina de tejocote en el desarrollo de sistemas alimenticios y puede contribuir a la obtención de pectina comercial a partir de una fuente hasta ahora no utilizada y al desarrollo económico y social de los productores de este cultivo.

#### **4. HIPÓTESIS**

Las características interfaciales de pectinas de tejocote, en términos de difusión, penetración y reacomodo configuracional de sus segmentos adsorbidos en interfases aceite-agua y su relación con sus propiedades fisicoquímicas pueden generar emulsiones estables grado alimenticio.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general**

Determinar para dos accesiones de tejocote sus propiedades fisicoquímicas, peso molecular, propiedades reológicas en soluciones acuosas, dinámicas de adsorción en la interfase aceite-agua, la capacidad para formar y estabilizar emulsiones aceite-en-agua.

### **5.2. Objetivos particulares**

Extraer y purificar las pectinas de tejocote de dos accesiones del banco de germoplasma de la Universidad Autónoma Chapingo.

Determinar las características fisicoquímicas y el peso molecular de pectinas de tejocote extraídas a partir de dos accesiones.

Estimar la viscosidad intrínseca y la conformación molecular de las diferentes accesiones de tejocote.

Evaluar las propiedades reológicas de soluciones acuosas de las dos pectinas de tejocote.

Determinar las dinámicas de adsorción de las pectinas de tejocote en la interfase aceite-agua.

Preparar emulsiones aceite-en-agua con las diferentes accesiones de tejocote y comparar su capacidad estabilizante respecto a la pectina cítrica.

Caracterizar las emulsiones aceite-en-agua mediante reología, difracción de luz, movilidad electroforética y sedimentación centrifuga.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Materiales**

Frutos de tejocote (*Crataegus* spp.) de las accesiones 50 (PT50) y 55 (PT55) fueron proporcionados por el Dr. Raúl Nieto Ángel del banco de germoplasma de tejocote de la Universidad Autónoma Chapingo (Texcoco, Estado de México, México). Pectina cítrica comercial (PC; clave del producto P9135) fue comprada de Sigma-Aldrich México (Toluca, Estado de México, México). Aceite de canola (Alimentos Capullo, Ciudad de México, México) fue purificado con florisil (malla 60-100, clave del producto 46385, Sigma-Aldrich México) y usado como la fase de aceite de las emulsiones. Los reactivos grado analítico usados fueron: Cloruro de sodio, ácido cítrico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, etanol obtenidos de J.T. Baker (Xalostoc, Estado de México, México) y ácido sulfámico, tetraborato de sodio, 3-fenilfenol de Sigma-Aldrich México (Toluca, Estado de México, México). El agua usada para todos los experimentos fue doblemente destilada y desionizada.

### **6.2. Extracción y purificación de la pectina**

La pectina fue extraída como sigue: 100 g de pulpa de fruta de tejocote (75.4 % humedad) fueron mezclados con 1 L de ácido cítrico (4 % p/v). La extracción fue llevada a cabo a 85 °C por 60 min en un baño de agua con agitación. El extracto resultante fue enfriado a temperatura ambiente ( $20 \pm 2$  °C) y filtrado a través de papel filtro Whatman No. 1 usando un embudo Buchner conectado a una bomba de vacío. Al filtrado obtenido se le adicionó etanol 96 % en una relación en volumen de 1:1 y se guardó en refrigeración por 24 h a 5 °C, para permitir la completa precipitación de la pectina y alcanzar el estado de equilibrio (Muhammad y col., 2014). La

pectina fue entonces separada por filtración a través de papel filtro Whatman No. 1 y lavada dos veces con etanol 70 % en una relación en volumen 1:1, para eliminar las impurezas. La mezcla fue centrifugada a  $3300 \times g$  durante 20 min a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  usando una centrifuga Sorvall RC-5B (GMI, Inc., Ramsay, MN, EUA) y el sobrenadante fue eliminado. El pellet fue dializado en membrana tubular con un tamaño de corte de peso molecular (*MWCO* por siglas en inglés) de 12,000 Da (Spectra/Por 6 Dialysis Membrane, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, EUA) con agua destilada a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 96 h, cambiando el agua de diálisis cada 12 h dos (Yapo, 2009). El material retenido dentro de los tubos de diálisis fue secado en un horno de aire circulante (Mettler, Wisconsin Oven Distributors, Eagle, WI, EUA) a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. La pectina seca fue molida en mortero hasta obtener un polvo fino. Los rendimientos de pectina en base seca ( $R_{bs}$ ) y base húmeda ( $R_{bh}$ ) fueron calculados usando las ecuaciones (1) y (2), respectivamente (Muhammad y col., 2014):

$$(\%) R_{bh} = 100 \langle \text{peso de pectina seca (g)} / \text{peso de la pulpa de tejocote (g)} \rangle \quad (1)$$

$$(\%) R_{bs} = 100 \left( \frac{R_{bh}}{100 - \text{contenido de humedad de la pulpa de tejocote}} \right) \quad (2)$$

### **6.3. Caracterización fisicoquímica de la pectina**

#### **6.3.1. Contenido de proteína total**

El porcentaje de nitrógeno en la pectina fue determinado por el método Kjeldahl usando un sistema Büchi (Scrubber 412, unidad de digestión 426 y unidad de destilación K-314; Büchi

Labortechnik AG, Flawil, Suiza). El contenido de proteína fue calculado usando un factor de conversión de 6.25 (AOAC, 1995).

### **6.3.2. Contenido de humedad**

El contenido de humedad fue estimado por calentamiento a 105 °C hasta obtener el peso constante (AOAC, 1995).

### **6.3.3. Contenido de cenizas**

El contenido de ceniza fue estimado gravimétricamente por incineración de la muestra en un horno de mufla (Felisa FE-340, EQUIPAR, Ciudad de México, México) a 550 °C hasta obtener peso constante de las muestras (AOAC, 1995).

### **6.3.4. Contenido de ácido galacturónico**

El ácido galacturónico fue determinado por método colorimétrico (Filisetti-Cozzi y Carpita, 1991). A un volumen de 0.4 mL de solución de pectina ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) se le adicionaron 40  $\mu\text{L}$  de sulfamato de potasio (4 M y pH de 1.6), en seguida se agregaron 2.5 mL de una solución de tetraborato de sodio 75 mM en ácido sulfúrico, la mezcla resultante fue homogenizada vigorosamente en un vortex GENIE 2 G560 (Scientific Industries, NY, EUA) durante 1 min y después enfriada a temperatura ambiente en un baño de hielo, posteriormente se colocó en un baño de agua hirviendo durante 15 min, la muestra fue enfriada inmediatamente en un baño de hielo durante 1.5 min. Finalmente, se adicionaron 80  $\mu\text{L}$  de 3-fenilfenol 0.15 % (p/v) en hidróxido de sodio 0.5 % y se mezcló en vortex durante 3 min, la absorbancia de las muestras fue medida a 525 nm usando un espectrofotómetro Globe CS-200PC (Spectronics Instruments, New York, EUA). La cuantificación de ácido galacturónico fue realizada mediante una curva



estándar de calibración usando ácido D-galacturónico como estándar (Sigma-Aldrich México, Toluca, Estado de México, México).

### **6.3.5. Contenido de fenoles totales**

El contenido fenólico total fue analizado usando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965), usando ácido gálico como estándar (Sigma-Aldrich México, Toluca, Estado de México, México). El contenido de fenoles totales fue expresado en  $\mu\text{g}$  de equivalentes de ácido gálico/mg de pectina.

### **6.3.6. Grado de esterificación**

El grado de esterificación (GE) de la pectina fue determinado de acuerdo al método de titulación propuesto por Singthong y col. (2004) con ligeras modificaciones. El polvo de pectina (500 mg) fue humedecido con 2 mL de etanol y disuelto en 100 mL de agua destilada libre de dióxido de carbono. Después que la muestra fue completamente disuelta, se adicionaron cinco gotas de fenolftaleína, entonces la muestra fue titulada con hidróxido de sodio 0.5 M, para neutralizar los ácidos carboxílicos libres del ácido galacturónico, el volumen gastado fue reportado como volumen inicial ( $V_1$ ). Entonces, 10 mL de hidróxido de sodio 0.5 M fueron adicionados, la muestra fue agitada vigorosamente durante 15 min para la hidrólisis; 10 mL de ácido clorhídrico 0.5 M fueron adicionados y agitados vigorosamente hasta la completa desaparición del color rosa de la solución. Finalmente, la muestra fue titulada con hidróxido de sodio 0.5 M con agitación vigorosa hasta que la muestra se tornó rosa ( $V_2$ ). El grado de esterificación de la pectina fue calculado usando la ecuación (3):

$$(\%) GE = [V_2 / (V_1 + V_2)] \times 10 \quad (3)$$

### 6.3.7. Porcentaje de metoxilo

El porcentaje de metoxilo (% MeO) fue determinado de acuerdo a Zouambia y col. (2016). La cantidad de metoxilo en 100 % de pectina esterificada es 16.32 %, por lo que el porcentaje de metoxilo fue calculado de la siguiente ecuación:

$$(\%) MeO = \frac{16.32}{100} \times GE \quad (4)$$

### 6.3.8. Peso molecular promedio

El peso molecular promedio ( $PM_{CPG}$ ) de la pectina fue determinado por cromatografía de permeación en gel (CPG) según el procedimiento de Román-Guerrero y col. (2009) con ligeras modificaciones. Soluciones de pectina ( $20 \text{ mg mL}^{-1}$ , NaCl 0.15 M) fueron solubilizadas bajo agitación magnética durante 30 min a temperatura ambiente ( $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y almacenadas por 24 h para lograr la completa hidratación, después fueron filtradas a través de filtros de membrana  $0.45 \text{ }\mu\text{m}$  (Millipore Co., Milford, NH, EUA) y manualmente inyectadas (5 mL) en la columna empacada con gel Sephacryl S-500-HR (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA) con un diámetro interno de 2.54 cm y 88.5 cm de largo, acoplada a un sistema de cromatografía de líquidos de baja presión (Biologic LP, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Como eluyente fue usado NaCl 0.15 M a una tasa de flujo de  $0.57 \text{ mL min}^{-1}$ . La elusión fue monitoreada por absorción UV a 280 nm. La curva de calibración fue hecha usando los siguientes estándares: Dextrano azul (2,000 kDa), tiroglobulina bovina (669 kDa),  $\gamma$ -globulina bovina (158 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), mioglobina equina (17 kDa) y vitamina B12 (1.35 kDa) (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

### 6.3.9. Viscosidad intrínseca y estimación de la conformación molecular

La determinación de la viscosidad intrínseca  $[\eta]$  fue realizada acorde al método de Burkus y Temelli (2003) con cambios menores. Soluciones estándar (0.1 % p/v) fueron preparadas dispersando el polvo de pectina en agua desionizada (NaCl 0, 25, 50 y 100 mM) bajo agitación magnética durante 30 min a temperatura ambiente hasta la completa disolución y fueron almacenadas a 25 °C por 24 h para obtener la completa hidratación. Cada solución estándar fue diluida en un rango de concentración de pectina (0.001-0.1 g 100 mL<sup>-1</sup>). Las muestras diluidas fueron agitadas vigorosamente sobre un mezclador tipo vortex y dejadas en equilibrio durante 15 min previo a las mediciones de viscosidad. La viscosidad fue determinada con un reómetro de corte dinámico Physica MCR 301 (Physica Messtechnik, Stuttgart, Alemania) usando la geometría de cilindros concéntricos DG26.7 con doble espacio a 25 °C a una velocidad constante de 62.1 s<sup>-1</sup> (20 rpm). Las viscosidades relativa ( $\eta_{rel}$ ), específica ( $\eta_{esp}$ ) y reducida ( $\eta_{red}$ ) fueron calculadas de las siguientes ecuaciones (5, 6, 7, respectivamente):

$$\eta_{rel} = \frac{\eta_{solución}}{\eta_{solvente}} \quad (5)$$

$$\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1 \quad (6)$$

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{esp}}{c} \quad (7)$$

donde  $\eta_{solución}$  es la viscosidad de la solución de pectina,  $\eta_{solvente}$  es la viscosidad del solvente (soluciones de NaCl 0, 25, 50 y 100 mM) y C es la concentración. La viscosidad intrínseca  $[\eta]$  fue calculada extrapolando linealmente la viscosidad reducida a concentración cero. La  $[\eta]$

estimada y el  $PM_{CPG}$  de las pectinas fueron relacionados a través de la ecuación de Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada (MHKS) (Morris y col., 2014):

$$[\eta] = k_{MHKS}[PM_{CPG}]^{a_{MHKS}} \quad (8)$$

o

$$\ln [\eta] = \ln k_{MHKS} + a_{MHKS} \ln PM_{CPG} \quad (9)$$

donde, las constantes empíricas  $k_{MHKS}$  y  $a_{MHKS}$  dependen de la temperatura así como del sistema polímero-solvente (Hiemenz y Rajagopalan, 1997). Las constantes  $k_{MHKS}$  y  $a_{MHKS}$  fueron determinadas por el intercepto y la pendiente de una gráfica doble logarítmica de  $[\eta]$  versus  $PM_{CPG}$  de las tres pectinas en orden de obtener información más detallada de su estructura hidrodinámica. El valor de  $a_{MHKS}$  puede ser usado como una estimación de la conformación macromolecular general, por lo tanto valores  $\sim 0$  corresponden a esferas, 0.5-0.8 a configuraciones al azar y valores mayores a 1.8 a formas lineales rígidas (Morris y col., 2014).

#### **6.4. Comportamiento de flujo de las soluciones de pectina**

El comportamiento de flujo de las soluciones de pectina (1 % p/p) fue medido usando el método descrito por Yuliarti y col. (2015). Curvas de viscosidad aparente de las muestras de pectina (3.7 mL) fueron obtenidas con un reómetro (Physica MCR 301, Physica Messtechnik, Stuttgart, Alemania) usando una geometría de cilindros concéntricos con doble espacio a 25 °C y tasas de corte entre 1 y 1000  $s^{-1}$ .

## **6.5. Tensión interfacial dinámica**

La tensión interfacial dinámica fue determinada usando el método descrito por Tang y Shen, (2015) con ligeras modificaciones. Las soluciones de pectina a 0.1, 0.5 y 1.0 % p/p fueron filtradas a través de un filtro de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore Co., Milford, NH, EUA). Las propiedades dinámicas superficiales de las pectinas en la interfase aceite-agua fueron monitoreadas grabando la evolución de la tensión interfacial ( $\gamma$ ) con el tiempo ( $\theta$ ). Un medidor de ángulo de contacto OCA-20, con un accesorio de gota oscilante ODG-20 (Dataphysics Instruments GmbH, Filderstadt, Alemania) fue usado en un modo dinámico para medir la tensión interfacial ( $\gamma$ ) en la interfase aceite-agua a 25 °C. Cada solución de pectina fue colocada en la jeringa y entonces una gota fue formada dentro de la cubeta de vidrio óptico conteniendo aceite de canola purificado. La disminución en la tensión interfacial fue monitoreada durante 10,800 s (3.0 h).

## **6.6. Preparación y caracterización de emulsiones**

### **6.6.1. Preparación de emulsiones**

Las emulsiones aceite-en-agua (O/W) fueron preparadas basadas en el procedimiento de Kermani y col. (2015) con algunas modificaciones. Las soluciones acuosas de PT50, PT55 y PC de 0.5, 1.0 y 1.5 % (p/p) fueron preparadas dispersando la pectina en agua desionizada a temperatura ambiente (25°C) en agitación por 30 min y después almacenadas a 4 °C durante 24 h para asegurar la completa hidratación de los biopolímeros. El pH de las soluciones fue ajustado a 3.5 adicionando NaOH 1.0 M o HCl 1.0 M. La fase dispersa (10 g de aceite de canola) fue adicionada gota a gota con agitación continua a la dispersión acuosa (90 g de solución de pectina) con ayuda de un homogeneizador Ultra-Turrax T50 basic (IKA Works, Inc.,

Wilmington, DE, EUA) a una velocidad rotacional de 6,000 rpm durante 3 min. Las emulsiones gruesas O/W fueron pasadas a través de un homogenizador de alta presión (Microfluidizer M-110P, Microfluidics, Corporation. Newton, MA, EUA) a 100 MPa por tres ciclos. Las emulsiones resultantes fueron codificadas como  $E_{x,y}$ , donde x = tipo de pectina usada (PT50, PT55, PC) mientras que y = concentración de pectina (0.5, 1.0, 1.5 % p/p).

### **6.6.2. Medición de viscosidad de corte**

La viscosidad aparente de las emulsiones (O/W) fue medida mediante pruebas rotacionales después de un día de su preparación. Las mediciones fueron realizadas en un reómetro MCR 301 (Physica Messtechnik, Stuttgart, Alemania) usando una geometría de cilindros concéntricos de doble espacio (DG26.7). Las muestras (3.7 mL) fueron colocadas en el cilindro y todas las mediciones reológicas fueron realizadas a 25 °C después de 5 min de equilibrio. Las curvas de flujo fueron obtenidas a tasas de corte de  $10^{-3}$  a  $10^3$   $s^{-1}$ . La viscosidad de corte aparente fue calculada en una tasa de corte de 50  $s^{-1}$ .

### **6.6.3. Determinación del tamaño de gota promedio**

El tamaño de gota volumétrico-superficial promedio ( $d_{3,2}$ ) y el *span* para expresar el ancho de distribución del tamaño de partícula (*PSD* por siglas en inglés) fueron determinados a emulsiones frescas y después de 1, 7, 14 y 28 días de almacenamiento ( $4 \pm 2$  °C) con un analizador de tamaño de partícula Malvern serie 2600 (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Un índice de refracción relativo de 1.104 (relación de los índices de refracción de las fases de aceite y agua).

#### **6.6.4. Potencial zeta**

El potencial- $\zeta$  de las emulsiones fue medido usando un equipo de electroforesis capilar automático (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido). Las muestras de emulsiones fueron diluidas en agua desionizada a una relación de 1:50 (v/v) y colocadas dentro de la celda de medición y el potencial- $\zeta$  fue calculado por el instrumento usando el modelo Smoluchowski (Burapapadh y col., 2010).

#### **6.6.5. Estabilidad al cremado**

La estabilidad de cremado de las emulsiones fue evaluada acorde al método descrito por Shimoni y col. (2013), usando el LUMisizer (LUM GmbH, Berlín, Alemania), un método nuevo empleando sedimentación centrífuga para acelerar la ocurrencia del fenómeno de inestabilidad como sedimentación, floculación o cremado. Cada variación de emulsión (0.4 mL) fue sometida a una velocidad rotacional de 2,000 rpm, durante 2 h a 25 °C. Cerca de 250 mediciones fueron determinadas a intervalos de tiempo de 30 s. Las gráficas de transmisión normalizada (%) contra posición (mm) fueron obtenidas y la velocidad de cremado (% transmisión integrada/h) obtenida de las pendientes fue proporcionada por el programa de análisis del equipo (Zhao y col., 2015).

#### **6.7. Análisis de datos**

Los análisis de datos fueron llevados a cabo por triplicado de 3 diferentes experimentos usando un diseño experimental completamente al azar. Los datos se sometieron a análisis de varianza de clasificación simple y a comparación de medias de Tukey. La significancia fue establecida en  $p \leq 0.05$ . El análisis de datos fue realizado utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA, EUA).

## **7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **7.1. Características fisicoquímicas de pectinas**

La Tabla 1 muestra las características fisicoquímicas de las pectinas estudiadas. La PT50 tuvo un rendimiento de  $20.9 \pm 0.6$  %, la cual no presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto a la PT50 ( $19.8 \pm 2.3$  %). Los rendimientos se encuentran dentro de los valores (16.7-19.1 %) reportados por otros autores para pectinas de tejocote (Li y col., 2008; Uysal y Yildirim, 2014). Las pectinas PT50 y PT55 no mostraron diferencias significativas entre ellas mismas respecto al grado de esterificación ( $78.2 \pm 0.6$  % y  $78.1 \pm 0.1$  %), contenido de ácido galacturónico ( $86.7 \pm 6.9$  % y  $86.0 \pm 3.1$  %) y contenido de metoxilo (12.7 %), respectivamente, pero fueron significativamente mayores a los valores mostrados por la PC. Las tres pectinas tuvieron un contenido de ácido galacturónico mayor que 65 %, lo cual es el límite más bajo requerido en las pectinas para ser clasificadas como pectinas grado comercial (Linares-García y col., 2015). De la misma manera, las tres pectinas pueden ser consideradas como pectinas de alto metoxilo con capacidad en tiempo de gelificación rápida porque el grado de esterificación fue mayor que el 72 % requerido para ser clasificadas como tal (Kermani y col., 2015).



**Tabla 1.** Rendimiento y características fisicoquímicas de pectinas purificadas extraídas de tejocote de dos diferentes accesiones comparadas a pectina cítrica.

|                             | Pectina                 |                         |                         |
|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                             | PC                      | PT50                    | PT55                    |
| Rendimiento (%)             | n.d.                    | 20.9 ± 0.6 <sup>a</sup> | 19.8 ± 2.3 <sup>a</sup> |
| Humedad (%)                 | 7.1 ± 1.9 <sup>b</sup>  | 4.5 ± 0.8 <sup>a</sup>  | 7.1 ± 0.4 <sup>b</sup>  |
| Proteína (%)                | 2.5 ± 0.1 <sup>a</sup>  | 3.5 ± 0.1 <sup>c</sup>  | 2.8 ± 0.1 <sup>b</sup>  |
| Cenizas (%)                 | 0.8 ± 0.1 <sup>b</sup>  | 0.2 ± 0.0 <sup>a</sup>  | 0.2 ± 0.0 <sup>a</sup>  |
| Ácido galacturónico (%)     | 71.2 ± 1.3 <sup>a</sup> | 86.7 ± 6.9 <sup>b</sup> | 86.0 ± 3.1 <sup>b</sup> |
| Fenoles totales (µg EAG/mg) | 3.02 ± 0.2 <sup>a</sup> | 8.40 ± 0.1 <sup>c</sup> | 6.94 ± 0.5 <sup>b</sup> |
| GE (%)                      | 72.5 ± 0.2 <sup>a</sup> | 78.2 ± 0.6 <sup>b</sup> | 78.1 ± 0.1 <sup>b</sup> |
| MeO (%)                     | 11.8 ± 0.0 <sup>a</sup> | 12.7 ± 0.1 <sup>b</sup> | 12.7 ± 0.0 <sup>b</sup> |
| PM <sub>CPG</sub> (Da)      | 75,193 <sup>a</sup>     | 202,110 <sup>c</sup>    | 184,990 <sup>b</sup>    |

Los datos son medias ± desviaciones estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencia significativa entre medias ( $p \leq 0.05$ ). No disponible (n.d.). Los porcentajes se dan en base seca (b.s.). EAG = equivalentes de ácido gálico. GE = grado de esterificación. MeO = metoxilo. PM = peso molecular. CPG = cromatografía de permeación en gel.

El peso molecular promedio, los contenidos de fenoles totales y proteína fueron significativamente mayores para PT50 (202,110 Da; 8.40 ± 0.1 µg EAG mg<sup>-1</sup>; 3.5 ± 0.1 %) que para PT55 (184,990 Da; 6.94 ± 0.5 µg EAG mg<sup>-1</sup>; 2.8 ± 0.1 %) y PC (75,193 Da; 3.02 ± 0.2 µg EAG mg<sup>-1</sup>; 2.5 ± 0.1 %), respectivamente. Una pectina cítrica de alto metoxilo (73,000 Da;

contenido de proteína de 2.8 %; grado de esterificación de 70 %) fue usada para estabilizar emulsiones aceite-en-agua (Schmidt y col., 2015). Linares-García y col. (2015) determinaron con datos de viscosidad intrínseca, que la pectina de tejocote con grado de esterificación de 89.1 % tuvo un peso molecular de 502,300 Da y una pectina cítrica con 70.3 % de grado de esterificación tuvo un peso molecular de 95,100 Da.

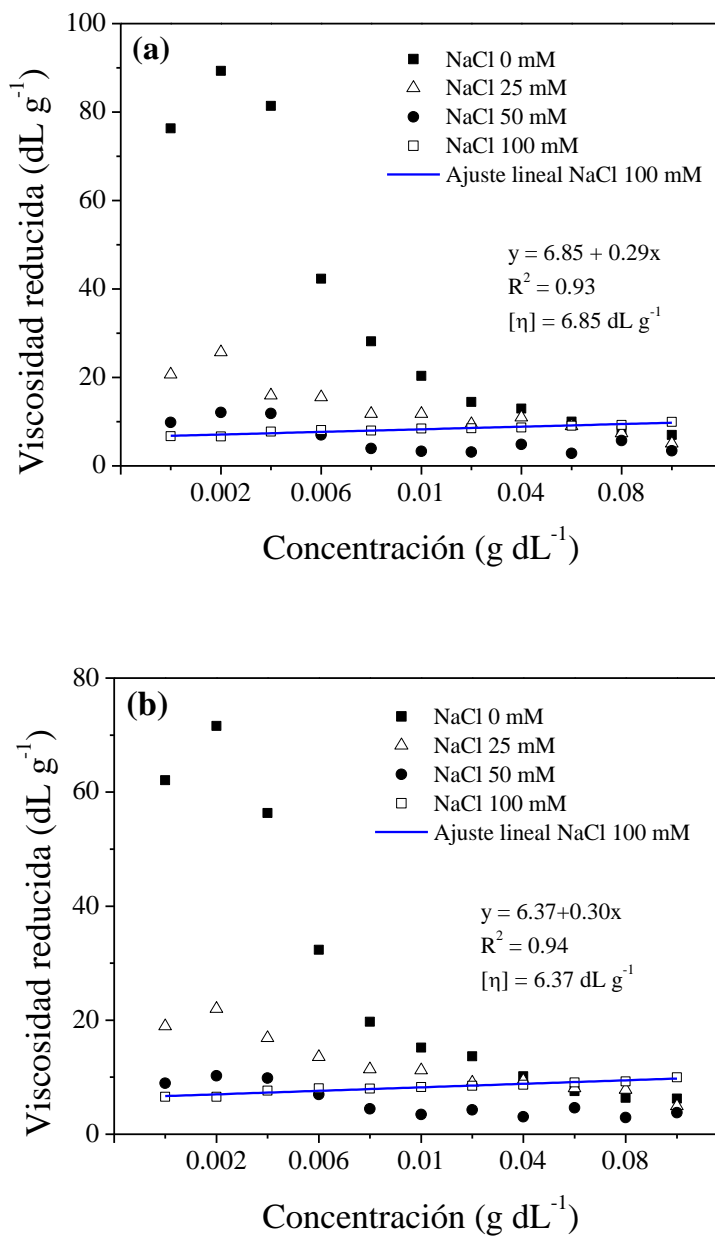
Los contenidos de proteína relativamente altos encontrados para PT50 y PT55 sugieren que pueden poseer buenas propiedades emulsificantes (Kermani y col., 2015).

## **7.2. Reología de soluciones acuosas de pectina**

### **7.2.1. Viscosidad intrínseca**

El comportamiento de la viscosidad reducida-concentración de soluciones acuosas de pectinas muy diluidas fue estudiado en orden de obtener su viscosidad intrínseca. Todas las sustancias macromoleculares en solución aumentan la viscosidad del solvente considerablemente, y cuanto mayor fue el tamaño molecular más grande fue el incremento (Behrouzian y col., 2014; Mohammad Amini y Razavi, 2012). Esto puede ser convenientemente relacionado con las funciones de viscosidad listadas en la Sección 6.3.9. La viscosidad reducida de una macromolécula neutra es dependiente de la concentración y la extrapolación del dato de viscosidad reducida a una concentración cero predice la viscosidad intrínseca, la cual mide el volumen hidrodinámico por gramo de sustancia macromolecular a una dilución infinita. Sin embargo, los polielectrólitos (pectinas) en agua no exhiben curvas de viscosidad reducida lineal en el rango de concentraciones en el que las sustancias macromoleculares neutras son

usualmente estudiadas ( $\sim 1\%$  p/v o menos). La curva de viscosidad reducida es una función de incremento continuo con la dilución, hasta un punto, en el cual las estructuras conformacionales de los polielectrólitos son expandidas por repulsión electrostática entre los segmentos de la cadena (Behrouzian y col., 2014). A extremadamente bajas concentraciones ( $\sim 10^{-3}$ ) la viscosidad reducida disminuye muy rápidamente con una dilución adicional. Una dependencia lineal de la viscosidad reducida sobre la concentración del polielectrólito puede ser obtenida si el solvente acuoso contiene una adecuada concentración de electrolito (Pasika, 1977). La Figura 6 a y b muestra la relación entre la viscosidad reducida de PT50 y PT55 contra la concentración, usando agua y diferentes concentraciones de NaCl como solvente. Como puede ser apreciada, una concentración de NaCl 100 mM genera una relación lineal. La linealidad entre la viscosidad reducida contra la concentración también ocurrió para PC cuando el solvente contenía NaCl 100 mM (datos no mostrados). Los valores de viscosidad intrínseca para PT50, PT55 y PC fueron 6.85, 6.35 y 3.37 dL g<sup>-1</sup>, respectivamente.



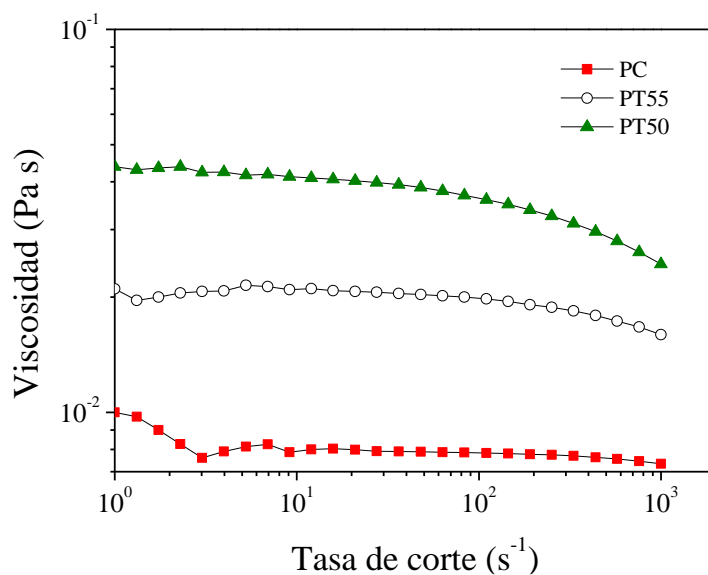
**Fig. 6.** Viscosidad reducida contra concentración de las pectinas: (a) PT50 y (b) PT55. La línea sólida muestra una relación lineal entre la viscosidad reducida y las concentraciones de pectina con NaCl 100 mM. Los valores de la regresión lineal y la viscosidad intrínseca son dados.

Una gráfica doble logarítmica de  $[\eta]$  contra los datos obtenidos de  $PM_{CPG}$  de las tres pectinas (PT50, PT55 y PC), dio un ajuste lineal ( $R^2 > 0.99$ ) con una pendiente (a) de  $0.71 \pm 0.02$  y un intercepto (k) de  $5.08 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-4} \text{ g dL}^{-1}$ . Del valor de a puede ser inferido que el tipo de conformación de las moléculas de pectina fue conformación estructural al azar (Chen y col., 2009). La significancia práctica de determinar los coeficientes a y k para un sistema particular mediante la viscosidad intrínseca de los biopolímeros de pesos moleculares conocidos es el poder determinar de una manera más fácil pesos moleculares desconocidos de otros biopolímeros bajo las mismas condiciones (Hiemenz y Rajagopalan, 1997). Este punto es crucial, ya que hay algunos estudios en los cuales el peso molecular-viscosimétrico de los biopolímeros es determinado usando la ecuación (9) con coeficientes a y k obtenidos de mediciones de  $[\eta]$  bajo diferentes condiciones (polímero-solvente, fuerza iónica, temperatura, etc.), así que el peso molecular reportado pueden ser solo un estimado (Jiang y col., 2012; Iglesias y Lozano, 2004; Migliori y col., 2010). Los coeficientes Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada determinados en este trabajo pueden ser usados para determinar el peso molecular-viscosimétrico de pectinas de otras fuentes botánicas o de otras accesiones de tejocote, si las condiciones del sistema son mantenidas constantes (25 °C, NaCl 100 mM).

### **7.2.2. Comportamiento de flujo de soluciones de pectina**

Las curvas de viscosidad aparente ( $\eta$ ) contra tasa de corte ( $\dot{\gamma}$ ) de soluciones de pectina (1 % p/p, pH 3.5) son presentadas en la Figura 7. En todos los casos, un comportamiento reodelgazante no-Newtoniano fue encontrado, que es muy similar al comportamiento reportado por soluciones de pectina de diferente origen botánico (Min y col., 2011; Vriesmann y col., 2011). A cualquier tasa de corte, PT50 presentó mayor  $\eta$  que PT55 y PC, incluso en otras concentraciones de

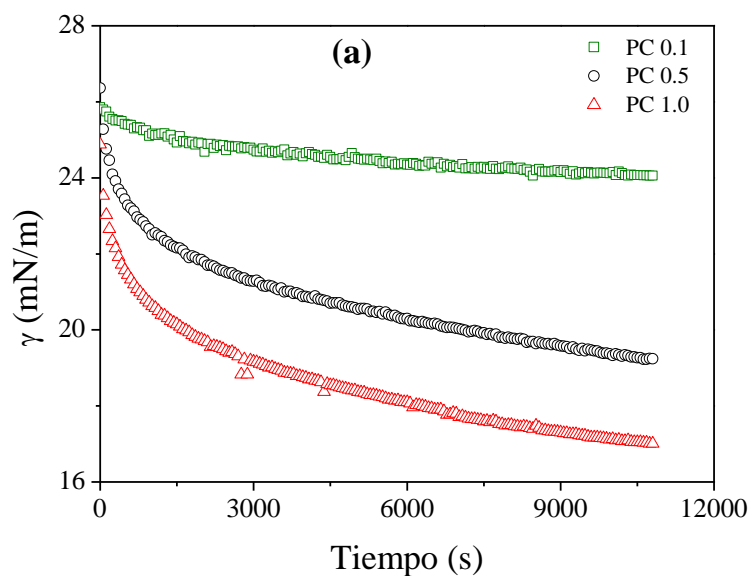
pectina (datos no mostrados). Así, esto mostró que el comportamiento de viscosidad de las soluciones de pectina estudiadas mantuvo una estrecha relación con el  $PM_{CPG}$  y GE. A mayor peso molecular y grado de esterificación las pectinas de tejocote tendieron a producir soluciones con mayor viscosidad aparente en todas las tasas de corte. Varios autores han señalado que la viscosidad aparente de soluciones de pectina depende de la masa molar (Williams y Phillips, 2000), rigidez y carga de las moléculas (Sengkhamparn y col., 2010), grado de esterificación (Migliori y col., 2010), la presencia de grupos acetil (Sengkhamparn y col., 2010) y ramificaciones laterales (Hwang y Kokini, 1992), entre otros factores.

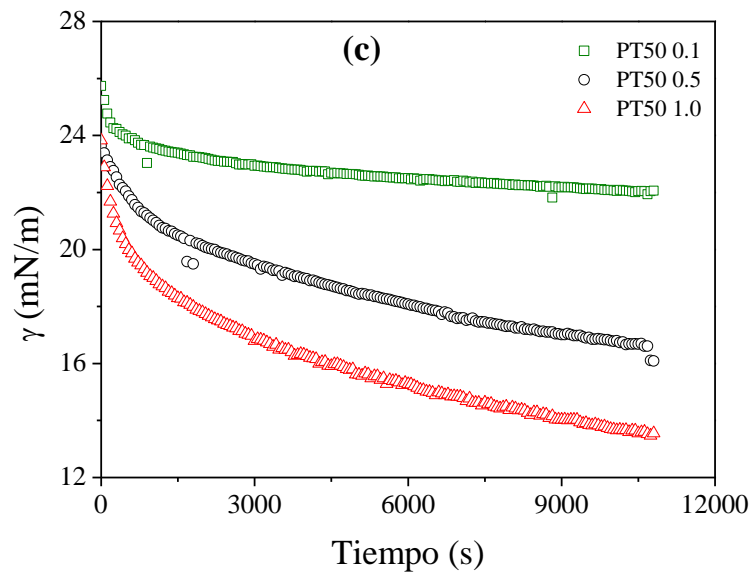
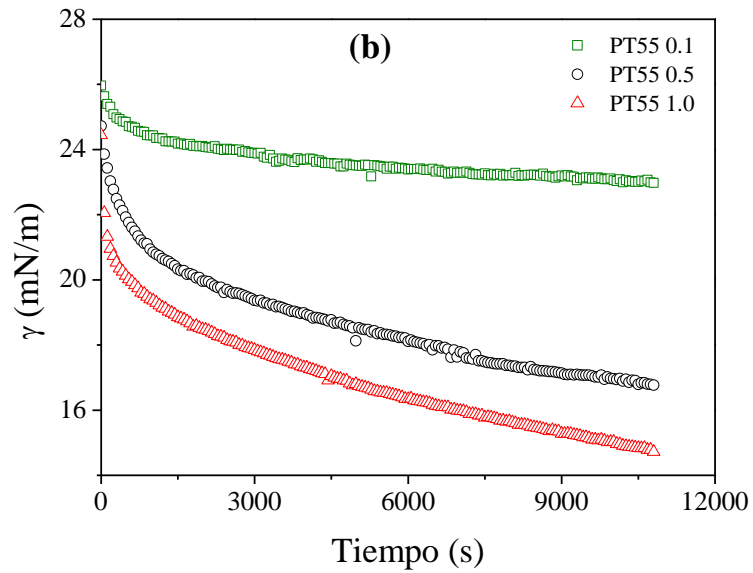


**Fig. 7.** Curvas de flujo de soluciones de pectina (1 % p/p) a pH 3.5 y 25 °C.

### 7.3. Dinámicas de adsorción

La disminución de la tensión interfacial con el tiempo en la interfase aceite de canola-agua en función del tipo de pectina y la concentración, presentaron similares perfiles como se ve en la Figura 8. La tensión interfacial en la interfase aceite puro de canola-agua fue de  $29 \text{ mN m}^{-1}$ . La caída inicial en la tensión interfacial fue sustancial durante los primeros segundos para todas las pectinas, independientemente de la concentración. Esto implica que el suministro de moléculas de pectina a la interfase por difusión fue lo suficientemente alto para formar una monocapa después de pocos minutos, probablemente debido a la adsorción de las fracciones ricas en proteína y polifenol así como también a los grupos carboxil metilados presentes en esos polisacáridos (Schmidt y col., 2015; Fissore y col., 2013).





**Fig. 8.** Evolución con el tiempo de la tensión interfacial ( $\gamma$ ) para adsorción de pectina a pH 3.5 en función de la concentración (0.1, 0.5 y 1 % p/p) en la interfase aceite-agua. (a) PC; (b) PT55 y (c) PT50.



A mayor concentración de pectina, más pronunciada fue la caída inicial en la tensión interfacial. La lenta disminución progresiva en la tensión interfacial a tiempos más largos podría estar relacionada al reacomodo de las moléculas de pectinas adsorbidas en la interfase. Cuando el suministro de moléculas por difusión es suficientemente alto, las moléculas que llegan a la interfase compiten por los sitios interfaciales. Bajo esas condiciones, las moléculas de pectina no serán adsorbidas en su forma más adecuada, así que ellas no tendrán espacio para desdoblarse y la mayor parte de cada molécula será proyectada hacia la fase continua. La reconformación de las moléculas de pectina en la interfase debe ser un proceso bastante lento (Vernon-Carter y Sherman, 1981). PT50, a pesar de tener el peso molecular más alto, presentó una mayor disminución en la tensión interfacial independientemente de la concentración en cualquier tiempo comparado con PT555 y PC. Uno esperaría que a mayor peso molecular de las pectinas difundieran más lentamente que las pectinas de menor peso molecular. Sin embargo, mayores contenidos de proteína, metoxil y fenoles totales en PT50, puede actuar como la fuerza que maneja la velocidad de difusión y anclaje en la interfase (Alba y Kontogiorgos, 2016). Desde este punto de vista, un apropiado balance entre el peso molecular y las fracciones que contribuyen a mayor hidrofobicidad de las moléculas de pectina pueden proveer características cruciales para mejorar las cinéticas de adsorción de esas moléculas a la interfase. Por lo tanto, PT50 presentó un mejor balance entre peso molecular e hidrofobicidad que PT55 y que PC.

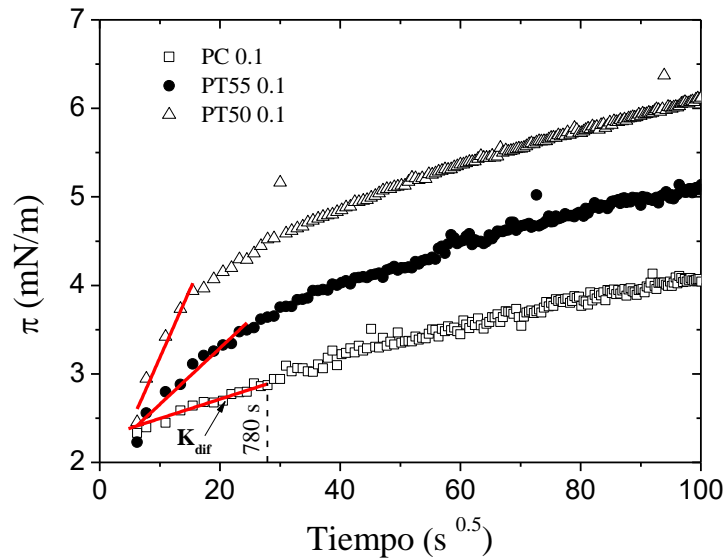
La evolución de la presión interfacial ( $\pi$ ) (figuras no mostradas) para las tres pectinas a diferentes concentraciones fue derivada de los datos de la Figura 8. En todos los casos  $\pi$  aumento progresivamente con el tiempo de adsorción y con el incremento de concentración de pectina, independientemente del tipo de pectina. La acumulación de la presión superficial con el tiempo

fue mayor para PT50 que para PT55 y PC. Los perfiles de las curvas de presión interfacial-tiempo indicaron que la cinética de adsorción de la pectina involucra varios mecanismos que pueden incluir: (i) difusión de la pectina del seno a la interfase, (ii) adsorción (penetración) a la interfase y desdoblamiento interfacial, (iii) reacomodo de las moléculas en la interfase, formación de multicapa y posible gelación interfacial (Camino y col., 2011). A presiones superficiales relativamente bajas, la tasa de difusión es el paso que controla este proceso y una forma modificada de la ecuación de Ward y Tordai, 1946 puede ser usada para correlacionar los cambios en la presión superficial con el tiempo:

$$\pi = 2C_0KT\left(\frac{D\theta}{3.14}\right)^{1/2} \quad (10)$$

donde  $C_0$  es la concentración de pectina inicial en la fase acuosa,  $K$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura absoluta,  $D$  es el coeficiente de difusión y  $\theta$  es el tiempo. La tasa de difusión fue obtenida al linealizar la curva de la gráfica de  $\pi$  contra la raíz cuadrada del tiempo ( $s^{0.5}$ ) y la pendiente de la gráfica fue la tasa de difusión ( $K_{dif}$ ) de las pectinas a la interfase aceite-agua (Camino y col., 2011; Ward y Tordai, 1946).

La raíz cuadrada del tiempo contra  $\pi$  para PT50, PT55 y PC a una concentración de 0.1 en la interfase aceite de canola-agua es mostrada en la Figura 9.



**Fig. 9.** La presión superficial ( $\pi$ ) contra la raíz cuadrada del tiempo ( $s^{0.5}$ ) para pectinas adsorbidas a pH 3.5 en la interfase aceite-agua, a una concentración de 0.1 % p/p. La línea sólida representa la pendiente de las curvas donde la adsorción es controlada por difusión.

Las curvas  $\pi$  contra la raíz cuadrada del tiempo para las otras concentraciones de 0.5 y 1 % mostraron perfiles similares, difieren solo en la pendiente inicial de las curvas, la tasa de difusión fue más pronunciada y ocurrió a tiempos más cortos al incrementar la concentración. Esto puede ser observado del cambio de pendiente de las curvas de la Figura 9, donde la adsorción que es controlada por la tasa de difusión en alguna concentración ocurre dentro de los primeros 780 s independientemente del tipo de pectina usada. Los valores de  $K_{dif}$  para las tres pectinas a diferentes concentraciones están dados en la Tabla 2, y fueron dados a concentraciones de pectina de menor a mayor como sigue: PC < PT55 < PT50. Esos resultados indican que el carácter hidrofóbico de las pectinas controla el fenómeno de difusión-adsorción.

**Tabla 2.** Parámetros dinámicos de adsorción de pectinas en la interfase aceite-agua.

| Pectina              | $K_{dif}$<br>( $mN m^{-1} s^{-0.5}$ ) | $K_1 \times 10^4$<br>( $s^{-1}$ ) | $K_2 \times 10^4$<br>( $s^{-1}$ ) |
|----------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| PC <sub>0.10</sub>   | 0.023 ± 0.00                          | 2.59 ± 0.01                       | 6.30 ± 0.38                       |
| PC <sub>0.50</sub>   | 0.105 ± 0.00                          | 2.57 ± 0.01                       | 9.42 ± 0.00                       |
| PC <sub>1.0</sub>    | 0.123 ± 0.04                          | 2.45 ± 0.02                       | 15.4 ± 0.01                       |
| PT55 <sub>0.10</sub> | 0.047 ± 0.01                          | 2.60 ± 0.02                       | 6.75 ± 0.09                       |
| PT55 <sub>0.50</sub> | 0.110 ± 0.06                          | 2.43 ± 0.02                       | 11.4 ± 0.00                       |
| PT55 <sub>1.0</sub>  | 0.129 ± 0.01                          | 2.36 ± 0.00                       | 16.5 ± 0.01                       |
| PT50 <sub>0.10</sub> | 0.072 ± 0.00                          | 0.078 ± 0.004                     |                                   |
| PT50 <sub>0.50</sub> | 0.113 ± 0.00                          | 0.076 ± 0.001                     |                                   |
| PT50 <sub>1.0</sub>  | 0.193 ± 0.00                          | 0.073 ± 0.001                     |                                   |

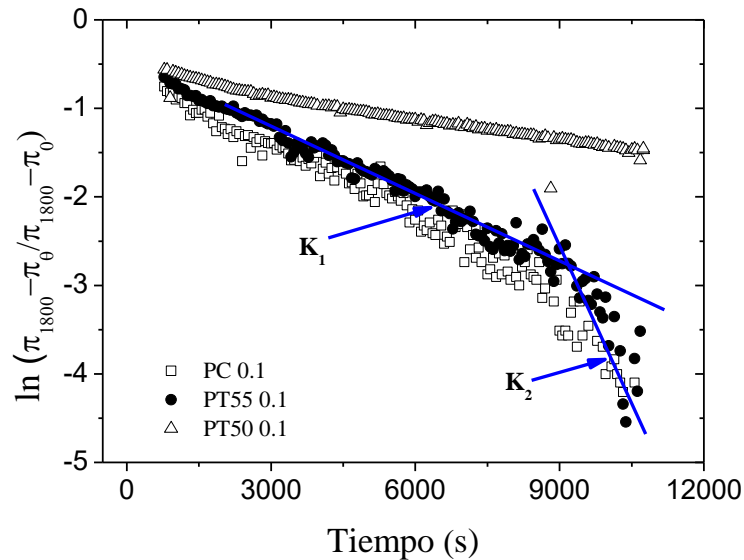
Estos mecanismos que limitan la velocidad de las moléculas de pectina adsorbidas en la interfase pueden ser monitoreados usando la siguiente ecuación de primer orden (Tang y Shen, 2015):

$$\ln [(\pi_{10800} - \pi_{\theta}) / (\pi_{10800} - \pi_0)] = -k_i \theta \quad (11)$$

donde  $\pi_{10800}$ ,  $\pi_{\theta}$  y  $\pi_0$  son las presiones superficiales en el tiempo de adsorción final (10,800 s), en algún tiempo ( $\theta$ ) y tiempo inicial (780 s en este caso), respectivamente. Una gráfica de  $\ln$

$[(\pi_{10800} - \pi_{\theta}) / (\pi_{10800} - \pi_0)]$  contra tiempo, donde el periodo corto de tiempo que controla la difusión ( $< 780$  s) es eliminado del análisis, durante el ajuste se pueden producir dos o más regiones lineales (Figura 10).

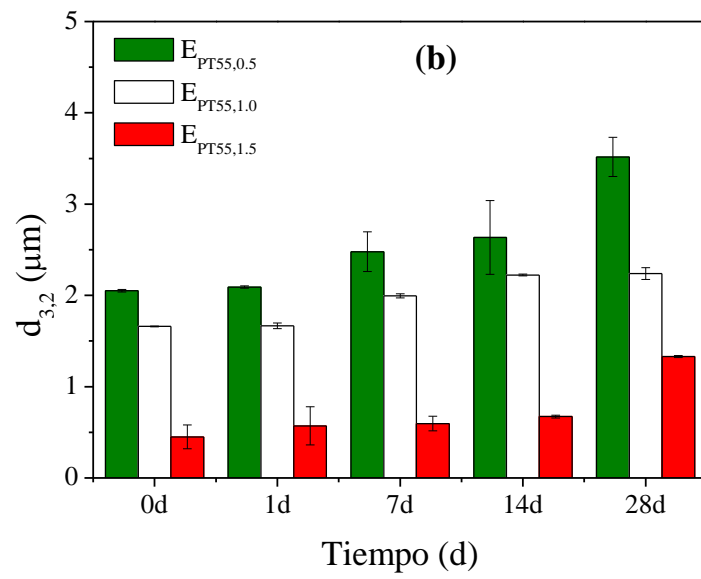
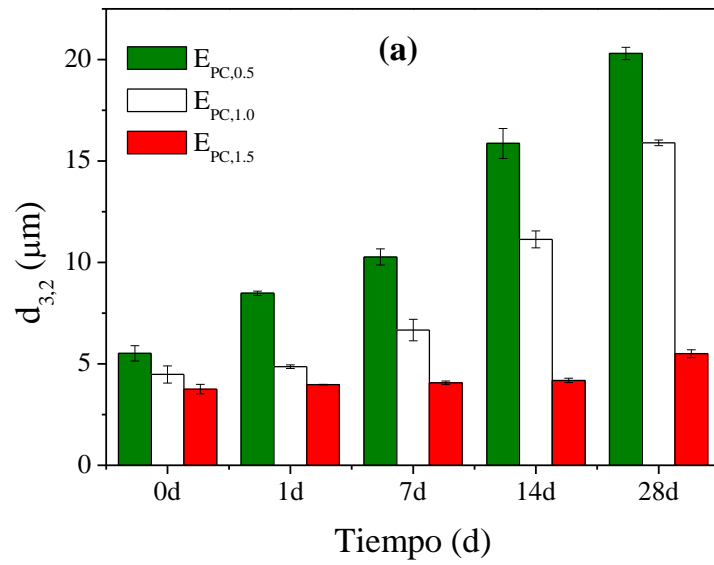
La Figura 10. muestra que mientras la PT50 a 0.1 % mostró solo una pendiente, PT55 y PC en la misma concentración mostraron dos pendientes. La primer pendiente está asociada a una barrera de energía que impide la penetración y desdoblamiento de las moléculas de pectina en la interfase, y es mostrada como la constante de penetración ( $K_1$ ), mientras que la segunda pendiente es asociada a la reconfiguración molecular de las moléculas en la interfase y es llamada como la constante de reacomodo molecular o estructural ( $K_2$ ) (Tang y Shen, 2015; Camino y col., 2011). A concentraciones de pectina de 0.5 y 1 % p/p, las tres pectinas mostraron un comportamiento similar como en 0.1 % (Figuras no mostradas). Los valores de las constantes  $K_1$  y  $K_2$  para PT50, PT55 y PC en función de la concentración son mostradas en la Tabla 2. La relevancia de esas constantes puede ser más claramente apreciado en la sección subsecuente en relación a la estabilidad de emulsiones.

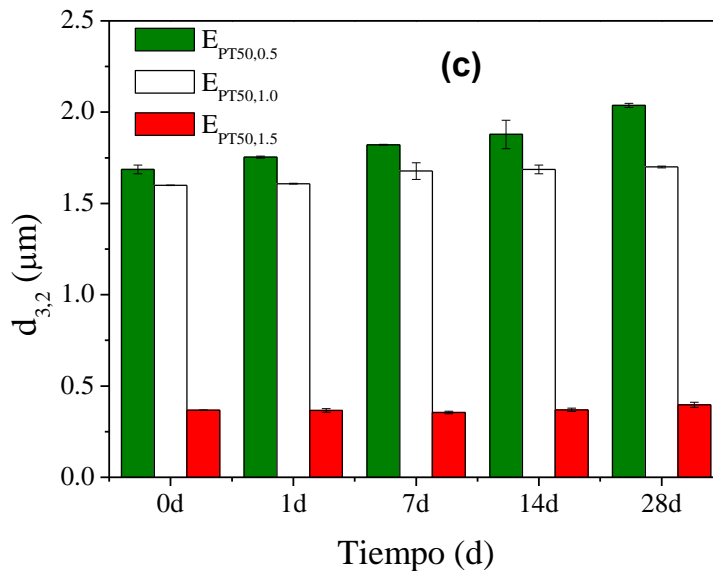


**Fig. 10.** Gráfica de  $\ln(\pi_f - \pi_\theta / \pi_f - \pi_0)$  contra el tiempo ( $\theta$ ) para pectinas adsorbidas a pH 3.5 en la interfase aceite-agua, a una concentración de 0.1 % p/p. La línea sólida de la primera pendiente representa el coeficiente de penetración ( $K_1$ ) y la segunda pendiente representa el coeficiente de reacomodo estructural ( $K_2$ ).

#### 7.4. Caracterización de emulsiones

La Figura 11 muestra la evolución en el tamaño de gota de las emulsiones aceite-agua preparadas usando PT50, PT55 y PC como agentes emulsificantes en concentraciones de 0.5, 1 y 1.5 % p/p durante 28 días a 4 °C.





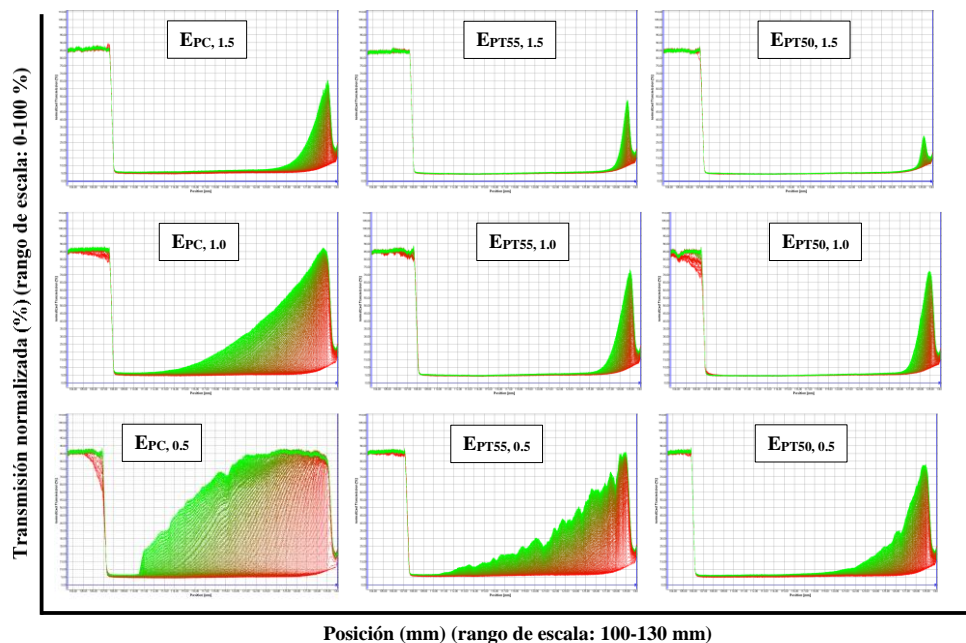
**Fig. 11.** Variación del tamaño de gota promedio de las emulsiones durante 28 días de almacenamiento a 4 °C: (a) PC; (b) PT55 y (c) PT50.

Diferencias significativas fueron observadas sobre el tamaño de gota inicial dependiendo del tipo de pectina y concentración. En todos los casos, el tamaño de gota inicial fue mayor cuando la concentración de pectina fue menor. A una concentración de 0.5 % p/p, el tamaño de gota inicial de las emulsiones varió como sigue:  $E_{PC,0.5}$  ( $5.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ) >  $E_{PT55,0.5}$  ( $2.0 \pm 0.1 \mu\text{m}$ ) >  $E_{PT50,0.5}$  ( $1.6 \pm 0.1 \mu\text{m}$ ). Al incrementar la concentración de pectina de 1.0 y 1.5 % p/p disminuyó significativamente con respecto a los tamaños presentados a 0.5 % p/p. Una concentración de emulsificante mayor es requerida a fin de formar gotas más pequeñas con mayor área superficial, ya que la cantidad de emulsificante disponible para formar una monocapa adsorbida sobre la superficie de gota de la emulsión controla el área superficial interfacial producida (Yuan y col.,



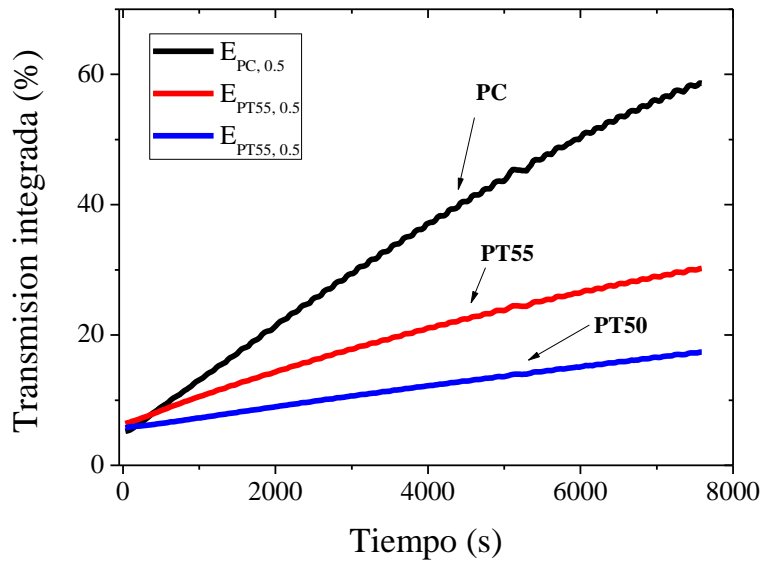
2008). Varios autores han reportado la formación de emulsiones aceite-en-agua estabilizadas con pectina de cáscara de mango, manzana, remolacha y cáscara de cítricos (rango de concentraciones de 0.3-1.2 % p/p) con tamaño de gota promedio en el rango entre 1-50  $\mu\text{m}$  (Schmidt y col., 2015; Kermani y col., 2015). E<sub>PT50</sub> exhibió las gotas de aceite más pequeñas en todas las concentraciones de pectina. Las macromoléculas que son efectivas en estabilización de emulsiones deben ser capaces de promover la formación de emulsiones y estabilización a tiempos cortos por acción interfacial y confiriendo estabilidad de la gota a largo plazo formando capas adsorbidas que promuevan un mecanismo de repulsión estérica (Dickinson, 2003). Los datos de la Figura 8 indican que las tres pectinas tienen la habilidad para disminuir la tensión interfacial, por lo que poseen capacidad emulsificante (Liang y col., 2015). La capacidad emulsificante es directamente relacionada a la cantidad de emulsificante adsorbido sobre la superficie de las gotas por unidad de volumen de emulsión. Durante el estado inicial de homogenización, la fase de aceite del seno es fraccionada en pequeñas gotas, las cuales se mezclan con la fase acuosa. Entre más rápido las moléculas emulsificantes lleguen y cubran la superficie de las gotas, más pequeñas resultará el tamaño de gota inicial y mayor será la capacidad emulsificante.  $K_{\text{dif}}$  fue significativamente mayor de PT50 que para PT55 y PC, significa que estas moléculas difunden y se anclan más rápidamente a la interfase, formando tamaños de gota inicial más pequeños (McClements, 2005). Una vez que las gotas pequeñas han sido formadas adecuadamente, consideraciones de gradientes de tensión interfacial o actividad superficial ya no son relevantes (Dickinson, 2003). Lo que importa para la estabilidad subsecuente a largo plazo es cómo las moléculas de polímero adsorbidas se conforman alrededor de las gotas de aceite, es decir, si son capaces de formar la capa estabilizante estérica gruesa y/o

una capa estabilizante con carga electrostática. Para este fin,  $K_1$  y  $K_2$  pueden proveer conocimientos. Como puede ser visto de la Tabla 2,  $K_1$  para PT50 fue significativamente más bajo que para PT55 y para PC en todas las concentraciones. En la práctica esto significa que las moléculas recién llegadas encuentran dificultad para penetrar la monocapa adsorbida existente y esto es un indicativo que la capa adsorbida de PT50 formada alrededor de las gotas fue más robusta. En contraste, las moléculas de PT55 y PC podrían penetrar relativamente más fácilmente la monocapa alrededor de la superficie de la gota. Por otra parte, PT50 no presentó una segunda pendiente, indicativo de que el empaquetamiento de las moléculas de PT50 en la interfase no permitió mucha libertad para el reacomodo de las moléculas, mientras PT55 y PC mostraron una segunda pendiente en todas las concentraciones, lo que indica que hubo lugar para el reacomodo de las moléculas de pectina substancial, debido a un empacamiento interfacial relativamente más lento que en el caso de PT50. Esto fue reflejado sobre la estabilidad de las emulsiones durante el tiempo. El aumento de tamaño de gota de las emulsiones  $E_{PT50}$  en cualquier concentración de pectina fue significativamente más bajo que el que haya ocurrido por las otras emulsiones  $E_{PT55}$  y  $E_{PC}$  (Figura 11). Además, los valores de *span* de las emulsiones varió de 4.48-2.88 para  $E_{PC}$  > 4.03-1.82 para  $E_{PT55}$  > 3.71-1.69 para  $E_{PT50}$  para las concentraciones en el rango entre 0.5 a 1.5 % p/p. Este resultado indica que a mayor concentración de pectina, independientemente del tipo, más baja fue la desproporción entre tamaños de gotas y mayor la estabilidad de emulsiones. Esto es confirmado por la velocidad de cremado de las emulsiones (Tabla 3). La estabilidad física de las emulsiones fue investigada bajo centrifugación analítica, la cual fue expresada como perfiles de transmisión normalizada-tiempo sobre la longitud que ocupa la muestra (Figura 12).



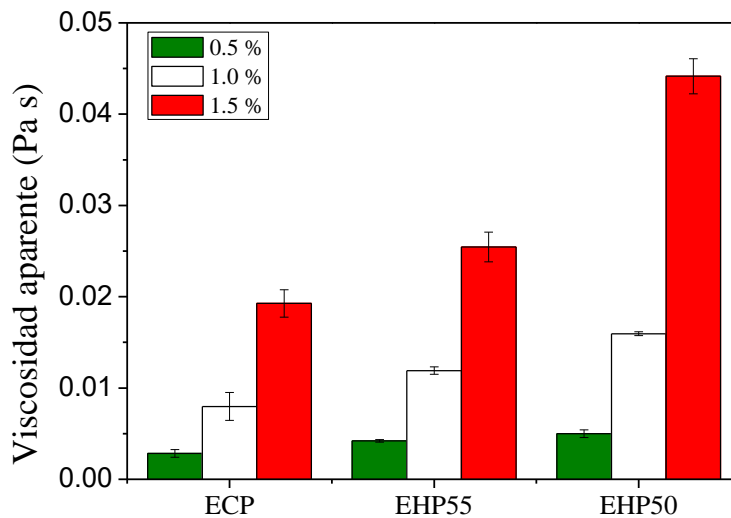
**Fig. 12.** Evolución de los perfiles de transmisión normalizada de las emulsiones estabilizadas con PC, PT55 y PT50 a diferentes concentraciones de pectina 0.5, 1 y 1.5 %.

Para obtener un mejor entendimiento de la estabilidad física de las emulsiones, la velocidad de cremado fue cuantificada al graficar los perfiles de transmisión integrada contra el tiempo de medición y la pendiente de la curva resultante corresponde a la velocidad de cremado, la cual fue inversamente relacionada a la estabilidad (Figura 13). Valores altos de la pendiente representan inestabilidad. Fue evidente que las pendiente de la E<sub>PT50</sub> a concentración de 1.5 % p/p fue significativamente más baja que el resto de las emulsiones, la separación o cremado fue mínima, resultando en pocos cambios de transmisión en el LUMiSizer y por tanto mínima pendiente, indicando que dichas emulsiones fueron altamente estables (Liu y col., 2016).



**Fig. 13.** Transmisión integrada contra tiempo de las emulsiones estabilizadas con PC, PT55 y PT50 a concentración de 0.5 %.

La velocidad de cremado fue afectada por el tipo y concentración de pectina usada para estabilizar las emulsiones. Al incrementar la concentración de pectina, la velocidad de cremado disminuyó en todos los casos. La velocidad de cremado guarda una estrecha relación con el tamaño de gota, *span* y con la viscosidad aparente de las emulsiones (Figura 14). Por lo tanto, más pequeño fue el tamaño de gota y mayor fue la viscosidad de las emulsiones, más bajo fue la tasa de cremado de las emulsiones (Tabla 3). Algunos autores, han reportado que a una mayor concentración de las gotas de tamaño más pequeño tiende a una formación mayor de una red tri-dimensional la cual combinada con una mayor viscosidad aparente previene el fenómeno de coalescencia y cremado debido a la disminución de la movilidad de las gotas (Dickinson, 2009; García-Márquez y col., 2015; Aben y col., 2012).



**Fig. 14.** Viscosidad aparente de las emulsiones aceite-en-agua con concentraciones de 0.5%, 1.0 % y 1.5 % de pectina de tejocote y cítrica a una tasa de corte calculada ( $50 \text{ s}^{-1}$ ).

Finalmente, a pesar de que todos los valores de potencial zeta de las gotas de las emulsiones fueron relativamente altos ( $> -28 \text{ mV}$ ) en todos los casos (Tabla 3), esto tuvo poco que ver sobre la mejora de la estabilidad de las emulsiones, por lo que la estabilización estérica combinada con la viscosidad aparente fueron los mecanismos estabilizantes dominantes.

**Tabla 3.** Potencial zeta y velocidad de cremado de las emulsiones.

| Emulsión               | Potencial zeta (mV)        | Velocidad de cremado<br>(% transmisión<br>integrada/h) |
|------------------------|----------------------------|--|
| E <sub>PC, 0.5</sub>   | -48.60 ± 0.56 <sup>a</sup> | 25.89 ± 0.64 <sup>a</sup>                              |
| E <sub>PC, 1.0</sub>   | -43.80 ± 0.60 <sup>b</sup> | 12.11 ± 0.08 <sup>b</sup>                              |
| E <sub>PC, 1.5</sub>   | -40.06 ± 0.49 <sup>c</sup> | 3.22 ± 0.04 <sup>e</sup>                               |
| E <sub>PT55, 0.5</sub> | -35.68 ± 0.27 <sup>d</sup> | 10.86 ± 0.68 <sup>c</sup>                              |
| E <sub>PT55, 1.0</sub> | -32.16 ± 0.33 <sup>f</sup> | 2.70 ± 0.05 <sup>f</sup>                               |
| E <sub>PT55, 1.5</sub> | -30.51 ± 0.50 <sup>g</sup> | 1.09 ± 0.20 <sup>g</sup>                               |
| E <sub>PT50, 0.5</sub> | -32.42 ± 0.42 <sup>f</sup> | 4.99 ± 0.59 <sup>d</sup>                               |
| E <sub>PT50, 1.0</sub> | -33.76 ± 0.20 <sup>e</sup> | 2.55 ± 0.20 <sup>f</sup>                               |
| E <sub>PT50, 1.5</sub> | -28.70 ± 0.25 <sup>h</sup> | 0.49 ± 0.04 <sup>h</sup>                               |

Medias ± desviaciones estándar. Diferentes letras en la misma columna indican diferencia significativa entre medias ( $p \leq 0.05$ ).

## 8. CONCLUSIONES

El fruto de tejocote puede ser una alternativa novedosa como fuente nueva de pectina proporcionando propiedades fisicoquímicas y funcionales diferentes a las pectinas comerciales. Los estudios de cinética de adsorción y los resultados de estabilidad de emulsiones aceite-en-agua indicaron que las pectinas de alto metoxilo de tejocote pueden ser consideradas eficientes agentes estabilizantes y emulsificantes cuando se usan por sí mismas, como resultado de un adecuado balance entre peso molecular alto y fracciones que contribuyen a la hidrofobicidad. Lo anterior es relevante, ya que es bien documentado que las pectinas de cáscara de cítricos y manzanas no exhiben buenas propiedades estabilizantes y emulsificantes. Otra importante contribución de este trabajo fue la determinación de los coeficientes Houwink-Mark-Kuhn-Sakurada, dichos coeficientes facilitarán la estimación del peso molecular viscosimétrico de pectinas de otras accesiones de tejocote u otra fuente vegetal, sólo con hacer mediciones simples de viscosidad intrínseca.

## 9. REFERENCIAS

Aben, S., Holtze, C., Tadros, T., Schurtenberger, P. (2012). Rheological investigations on the creaming of depletion-flocculated emulsions. *Langmuir*, 28, 7967-7975.

Adetunji, L.R., Adekunle, A., Orsat, V., Raghavan, V. (2017). Advances in the pectin production process using novel extraction techniques: A review. *Food Hydrocolloids*, 62, 239-250.

Alba, K., Kontogiorgos, V. (2016). Pectin at the oil-water interface: Relationship of molecular composition and structure to functionality. *Food Hydrocolloids*, In press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.07.026>

Alba, K., Sagis, L.M.C., Kontogiorgos, V. (2016). Engineering of acidic O/W emulsions with pectin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 145, 301-308.

Akhtar, M., Dickinson, E., Mazoyer, J., Langendorff, V. (2002). Emulsion stabilizing properties of depolymerized pectin. *Food Hydrocolloids*, 16, 249–256.

Andersson, M.P., Bennetzen, M.V., Klamt, A., Stipp, S.L.S. (2014). First-principles prediction of liquid/liquid interfacial tension. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 10, 3401-3408.

AOAC. (1995). Official methods of analysis, 16th ed., Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

Behrouzian, F., Razavi, S.M.A., Karazhiyan, H. (2014). Intrinsic of cress (*Lepidium sativum*) seed gum: Effect of salts and sugars. *Food Hydrocolloids*, 35, 100-105.

Burapapadh, K., Kumpugdee-Vollrath, M., Chantasartd, D., Sriamornsaka, P. (2010). Fabrication of pectin-based nanoemulsions loaded with itraconazole for pharmaceutical application. *Carbohydrate Polymers*, 82, 384–393.

Burkus, Z., Temelli, F. (2003). Determination of the molecular weight of barley  $\beta$ -glucan using intrinsic viscosity measurements. *Carbohydrate Polymers*, 54, 51-57.



Camino, N.A., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J.M., Pilosof, A.M.R. (2011). Hydroxypropylmethylcellulose at the oil-water interface. Part I. Bulk behavior and dynamic adsorption as affected by pH. *Food Hydrocolloids*, 25, 1-11.

Chang, C.L., Chen, H.S., Shen, Y.C., Lai, G.H., Lin, P.K., Wang, C.M. (2013). Phytochemical composition, antioxidant activity and neuroprotective effect of *Crataegus pinnatifida* fruit. *South African Journal of Botany*, 88, 432-437.

Chen, R.H., Chen, W.Y., Wang, S.T., Hsu, C.H., Tsai, M.L. (2009). Changes in the Mark-Houwink hydrodynamic volume of chitosan molecules in solutions of different organic acids, at different temperatures and ionic strengths. *Carbohydrate Polymers*, 78, 902-907.

Chen, Y., Zhang, J.G., Sun, H.J., Wei, Z.J. (2014). Pectin from *Abelmoschus esculentus*: Optimization of extraction and rheological properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 498-505.

Cui, S.W., Chang, Y.H. (2014). Emulsifying and structural properties of pectin enzymatically extracted from pumpkin. *LWT – Food Science and Technology*, 58, 396-403.

Denman, L.J., Morris, G.A. (2015). An experimental design approach to the chemical characterization of pectin polysaccharides extracted from *Cucumis melo* Inodorus. *Carbohydrate Polymers*, 117, 364-369.

Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 25-39.

Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilisers. *Food Hydrocolloids*, 23, 1473-1482.

Edwards, J.E., Brown, P.N., Talent, N., Dickinson, T.A., Shipley, P.R. (2012). A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochemistry*, 79, 5-26.

Filisetti-Cozzi, T.M.C.C., Carpita, N.C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, 197, 157-162.

Fishman, M.L., Chau, H.K., Qi, P.X., Hotchkiss, A.T., Garcia, R.A., Cooke, P.H. (2015). Characterization of the global structure of low methoxyl pectin in solution. *Food Hydrocolloids*, 46, 153-159.

Fissore, E.N., Rojas, A.M., Gerschenson, L.N., Williams, P.A. (2013). Butternut and beetroot pectins: Characterization and functional properties. *Food Hydrocolloids*, 31, 172-182.

Foudazi, R., Qavi, S., Masalova, I., Malkin, A.Y. (2015). Physical chemistry of highly concentrated emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 220, 78-91.

Freitas de Oliveira, C., Giordani, D., Lutckemier, R., Gurak, P.D., Cladera-Olivera, F., Ferreira-Marczak, L.D. (2016). Extraction of pectin from passion fruit peel assisted by ultrasound. *LWT – Food Science and Technology*, 71, 110-115.

García-Márquez, E., Román-Guerrero, A., Cruz-Sosa, F., Lobato-Calleros, C., Álvarez-Ramírez, J., Vernon-Carter, E.J., Espinosa-Andrews, H. (2015). Effect of layer (calcium phosphate-chitosan)-by-layer (mesquite gum) matrix on carotenoids-in-water-emulsion properties. *Food Hydrocolloids*, 43, 451-458.

Grassino, A.N., Brncic, M., Vikić-Topić, D., Roca, S., Dent, M., Brncić, S.R. (2016). Ultrasound assisted extraction and characterization of pectin from tomato waste. *Food Chemistry*, 198, 93-100.

Gülseren, I., Corredig, M. (2014). Interactions between polyglycerol polyricinoleate (PGPR) and pectins at the oil-water interface and their influence on the stability of water-in-oil-emulsions. *Food Hydrocolloids*, 34, 154-160.

Gundogdu, M., Ozrenk, K., Ercisli, S., Kan, T., Kodad, O., Hegedus, A. (2014). Organic acids, sugars, vitamin C content and some pomological characteristics of eleven hawthorn species (*Crataegus* spp.) from Turkey. *Biological Research*, 47, 1-5.

Hiemenz, P.C., Rajagopalan, R. (1997). Principles of colloid and surface chemistry, third ed., Marcel Dekker, Inc., New York.

Hwang, J., Kokini, J.L. (1992). Contribution of the side branches to rheological properties of pectins. *Carbohydrate Polymers*, 19, 41-50.

Iglesias, M.T., Lozano, J.E. (2004). Extraction and characterization of sunflower pectin, *Journal of Food Engineering*, 62, 215-223.

Jiang, Y., Du, Y., Zhu, X., Xiong, H., Woo, M.W., Hu, J. (2012). Physicochemical and comparative properties of pectins extracted from *Akebia trifoliata* var. *australis* peel. *Carbohydrate Polymers*, 87, 1663– 1669.

Kermani, Z.J., Shpigelman, A., Pham, H.T.T., Van Loey, A.M., Hendrickx, M.E. (2015). Functional properties of citric acid extracted mango peel pectin as related to its chemical structure. *Food Hydrocolloids*, 44, 424-434.

Koubala, B.B., Christiaens, S., Kansci, G., Van Loey, A.M., Hendrickx, M.E. (2014). Isolation and structural characterisation of papaya peel pectin. *Food Research International*, 55, 215-221.

Langevin, D. (2000). Influence of interfacial rheology on foam and emulsion properties. *Advances in Colloid and Interface Science*, 88, 209-222.

Leroux, J., Langendorff, G., Schick, G., Vaishnav, V., Mazoyer, J. (2003). Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids*, 17, 455-462.

Li, L.Z., Gao, P.Y., Song, S.J., Yuan, Y.Q., Liu, C.T., Huang, X.X., Liu, Q.B. (2015). Monoterpenes and flavones from the leaves of *Crataegus pinnatifida* with anticoagulant activities. *Journal of Functional Foods*, 12, 237-245.

Li, T., Li, S., Wang, N., Liu, J. (2008). Physicochemical properties and partial structural features of haw pectin. *European Food Research and Technology*, 227, 1035-1041.

Li, W.Q., Hu, Q.P., Xu, J.G. (2015). Changes in physicochemical characteristics and free amino acids of hawthorn (*Crataegus pinnatifida*) fruits during maturation. *Food Chemistry*, 175, 50-56.

Liang, R.H., Wang, L.H., Chen, J., Liu, W., Liu, C.M. (2015). Alkylated pectin: Synthesis, characterization, viscosity and emulsifying properties. *Food Hydrocolloids*, 50, 65-73.

Linares-García, J.A., Ramos-Ramírez, E.G., Salazar-Montoya, J.A. (2015). Viscoelastic properties and textural characterisation of high methoxyl pectin of hawthorn (*Crataegus pubescens*) in a gelling system. *International Journal of Food Science & Technology*, 50, 1414-1493.

Liu, F., Wang, L., Sun, C., Gao, Y. (2016). Influence of polysaccharides on the physicochemical properties of lactoferrin-polyphenol conjugates coated  $\beta$ -carotene emulsions. *Food Hydrocolloids*, 52, 661-669.

Liu, P., Kallio, H., Lü, D., Zhou, C., Yang, B. (2011). Quantitative analysis of phenolic compounds in Chinese hawthorn (*Crataegus* spp.) fruits by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, 127, 1370-1377.

Liu, S., Chang, X., Liu, X., Shen, Z. (2016). Effects of pretreatments on anthocyanin composition, phenolics contents and antioxidant capacities during fermentation of hawthorn (*Crataegus pinnatifida*) drink. *Food Chemistry*, 212, 87-95.

Maldonado-Valderrama, J., Torcello-Gómez, A., del Castillo-Santaella, T., Holgado-Terriza, J.A., Cabrerizo-Vílchez, M.A. (2015). Subphase Exchange experiments with the pendant drop technique. *Advances in Colloid and Interface Science*, 222, 488-501.

Maran, J.P., Prakash, K.A. (2015). Process variables influence on microwave assisted extraction of pectin from waste *Carica papaya* L. peel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 73, 202-206.

McClements, D.J. (2005). Food emulsions: Principles, practices, and techniques, second ed., CRC Press, USA.

McClements, D.J., Gumus, C.E. (2016). Natural emulsifiers - biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. *Advances in Colloid and Interface Science*, 234, 3-26.

Mesbahi, G., Jamalain, J., Farahnaky, A. (2005). A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in food systems. *Food Hydrocolloids*, 19, 731-738.

Mierczynska, J., Cybulska, J., Zdunek, A. (2017). Rheological and chemical properties of pectin enriched fractions from different sources extracted with citric acid. *Carbohydrate Polymers*, 156, 443-451.

Migliori, M., Gabriele, D., Checchetti, A., Battipede, B. (2010). Compatibility analysis of pectin at different esterification degree from intrinsic viscosity data of diluted ternary solutions. *Reactive and Functional Polymers*, 70, 863-867.

Min, B., Lim, J., Ko, S., Lee, K.G., Lee, S.H., Lee, S. (2011). Environmentally friendly preparation of pectins from agricultural byproducts and their structural/rheological characterization. *Bioresource Technology*, 102, 3855-3860.

Mohammad Amini, A., Razavi, S.M.A. (2012). Dilute solution properties of Balangu (*Lallemantia royleana*) seed gum: Effect of temperature, salt, and sugar. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51, 235-243.

Morris, G.A., Adams, G.G., Harding, S.E. (2014). On hydrodynamic methods for the analysis of the sizes and shapes of polysaccharides in dilute solution: A short review. *Food Hydrocolloids*, 42, 318-334.

Mraihi, F., Hidalgo, M., de Pascual-Teresa, S., Trabelsi-Ayadi, M., Chérif, J.K. (2015). Wild grown red and yellow hawthorn fruits from Tunisia as source of antioxidants. *Arabian Journal of Chemistry*, 8, 570-578.

Muhammad, K., Zahari, N.I.M., Gannasin, S.P., Adzahan, N.M., Bakar, J. (2014). High methoxyl pectin from dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peel. *Food Hydrocolloids*, 42, 289-297.

Munarin, F., Tanzi, M.C., Petrini, P. (2012). Advances in biomedical applications of pectin gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51, 681– 689.

Nieto-Ángel, R., Pérez-Ortega, S.A., Núñez-Colín, C.A., Martínez-Solís, J., González-Ándres, F. (2009). Seed and endocarp traits as markers of the biodiversity of regional sources of germplasm of *tejocote* (*Crataegus* spp.) from Central and Southern Mexico. *Scientia Horticulturae*, 121, 166-170.

Núñez-Colín, C.A., Nieto-Ángel, R., Barrientos-Priego, A.F., Sahagún-Castellanos, J., Segura, S., González-Andrés, F. (2008). Variability of three regional sources of germplasm of Tejocote (*Crataegus* spp.) from central and southern Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55, 1159-1165.

Ozturk, B., McClements, D.J. (2016). Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsions. *Current Opinion in Food Science*, 7, 1-6.

Pasika, W.M. (1977). Polysaccharide Polyelectrolytes. *In*: Sanford, P.A., Laskin, A. (Eds.), Extracellular microbial Polysaccharides, (Eds.), ACS Symp.Ser 45, Washington, D.C., pp. 128-143.

Perez, A.A., Carrera-Sánchez, C., Rodríguez-Patino, J. M., Rubiolo, A.C., Santiago, L.G. (2010). Milk whey proteins and xanthan gum interactions in solution and at the air-water interface: A rheokinetic study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81, 50-57.

Perez, A.A., Sánchez, C.C., Rodríguez Patino, J.M., Rubiolo, A.C., Santiago, L.G. (2011). Surface adsorption behaviour of milk whey protein and pectin mixtures under conditions of air–water interface saturation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85, 306-315.

Pérez-Orozco, J.P., Beristain, C.I., Espinosa-Paredes, G., Lobato-Calleros, C., Vernon-Carter, E.J. (2004). Interfacial shear rheology of interacting carbohydrate polyelectrolytes at the water-oil interface using an adapted conventional rheometer. *Carbohydrate Polymers*, 57, 45-54.

Qiao, A., Wang, Y., Xiang, L., Zhang, Z., He, X. (2015). Novel triterpenoids isolated from hawthorn berries functioned as antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of Functional Foods*, 13, 308-313.

Rodrigues, S., Calhelha, R.C., Barreira, J.C.M., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Abreu, R.M.V., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R. (2012). *Crataegus monogyna* buds and fruits phenolic extracts: Growth inhibitory activity on human tumor cell lines and chemical characterization by HPLC-DAD-ESI/MS. *Food Research International*, 49, 516-523.

Román-Guerrero, A., Orozco-Villafuente, J., Pérez-Orozco, J.P., Cruz-Sosa, F., Jiménez-Alvarado, R., Vernon-Carter, E.J. (2009). Application and evaluation of mesquite gum and its fractions as interfacial film formers and emulsifiers of orange peel-oil. *Food Hydrocolloids*, 23, 708-713.

Rubio-Senent, F., Rodríguez-Gutiérrez, G., Lama-Muñoz, A., García, A., Fernández-Bolaños, J. (2015). Novel pectin present in new olive mill wastewater with similar emulsifying and better biological properties than citrus pectin. *Food Hydrocolloids*, 50, 237-746.

Saad, S., Neumann, A., Axisymmetric drop shape analysis (ADSA): An outline, *Advances in Colloid and Interface Science* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2016.11.001>

Schmidt, U.S., Schmidt, K., Kurz, T., Endreß, H.U., Schuchmann, H.P. (2015). Pectins of different origin and their performance in forming and stabilizing oil-in-water-emulsions. *Food Hydrocolloids*, 46, 59-66.

Seixas, F.L., Fukuda, D.L., Turbiani, F.R.B., Garcia, P.S., Petkowicz, C.L.O., Jagadevan, S., Gimenes, M.L. (2014). Extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) by microwave-induced heating. *Food Hydrocolloids*, 38, 186-192.

Sengkhampan, N., Sargis, L.M.C., de Vries, R., Schols, H.A., Sajjaanatakul, T., Voragen, A.G.J. (2010). Physicochemical properties of pectins from okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). *Food Hydrocolloids*, 24, 35-41.

Shimoni, G., Shani Levi, C., Levi Tal, S., Lesmes, U. (2013). Emulsions stabilization by lactoferrin nano-particles under in vitro digestion conditions. *Food Hydrocolloids*, 33, 264-272.

Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

Singthong, J., Cui, S.W., Ningsanond, S., Goff, H.D. (2004). Structural characterization, degree of esterification and some gelling properties of Krueo Ma Noy (*Cissampelos pareira*) pectin. *Carbohydrate Polymers*, 58, 391-400.

Song, S.J., Li, L.Z., Gao, P.Y., Peng, Y., Yang, J.Y., Wu, C.F. (2011). Terpenoids and hexenes from the leaves of *Crataegus pinnatifida*. *Food Chemistry*, 129, 933-939.

Sousa, A.G., Nielsen, H.L., Armagan, I., Larsen, J., Sorensen, S.O. (2015). The impact of rhamnogalacturonan-I side chain monosaccharides on the rheological properties of citrus pectin. *Food Hydrocolloids*, 47, 130-139.

Sundar Raj, A.A., Rubila, S., Jayabalan, R., Ranganathan, T.V. (2012). A review on pectin: Chemistry due to general properties of pectin and its pharmaceutical uses. *Scientific Reports*, 1, 1-4.

Tang, C.H., Shen, L. (2015). Dynamic adsorption and dilatational properties of BSA at oil/water interface: Role of conformational flexibility. *Food Hydrocolloids*, 43, 388-399.

Torcello-Gómez, A., Jódar-Reyes, A.B., Maldonado-Valderrama, J., Martín-Rodríguez, A. (2012). Effect of emulsifier type against the action of bile salts at oil-water interfaces. *Food Research International*, 48, 140-147.

Uysal, S.Y., Yildirim, E. (2014). Extraction and characterisation of pectin from red hawthorn (*Crataegus* spp.) using citric acid and lemon juice. *Asian Journal of Chemistry*, 26, 6674-6678.

Vernon-Carter, E.J., Sherman, P. (1981). Rheological properties and applications of mesquite tree (*Prosopis juliflora*) gum. 3. The influence of mesquite gum on the interfacial tension between oil and water. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 2, 381-396.



Vivar-Vera, M.A., Salazar-Montoya, J.A., Calva-Calva, G., Ramos-Ramírez, E.G. (2007). Extraction, thermal stability and kinetic behavior of pectinmethylesterase from hawthorn (*Crataegus pubescens*) fruit. *LWT-Food Science and Technology*, 40, 278-284.

Vriesmann, L.C., Amboni, R.D.M.C., Petkowicz, C.L.O. (2011). Cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.): Composition and hot-water-soluble pectins. *Industrial Crops and Products*, 34, 1173-1181.

Ward, A.F.H., Tordai, L. (1946). Time dependence of boundary tensions of solutions. *The Journal of Chemical Physics*, 14, 353-361.

Willats, W.G.T., Knox, J.P., Mikkelsen, J.D. (2006). Pectin: New insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 97-104.

Williams, P.A., Phillips, G.O. (2000). Introduction to food hydrocolloids, *In*: Williams, P.A., Phillips, G.O. (Eds.), *Handbook of Hydrocolloids*, CRC Press, USA, pp. 1-19.

Wulff-Pérez, M., Torcello-Gómez, A., Martín-Rodríguez, A., Gálvez-Ruiz, M.J., de Vicente, J. (2011). Bulk and interfacial viscoelasticity in concentrated emulsions: The role of the surfactant. *Food Hydrocolloids*, 25, 677-686.

Yapo, B.M. (2009). Pectin quantity, composition and physicochemical behaviour as influenced by the purification process. *Food Research International*, 42, 1197-1202.

Yuan, Y., Gao, Y., Zhao, J., Mao, L. (2008). Characterization and stability evaluation of  $\beta$ -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. *Food Research International*, 41, 61-68.

Yuliarti, O., Matia-Merino, L., Goth, K.K.T., Mawson, J., Williams, M.A.K., Brennan, C. (2015). Characterization of gold kiwifruit pectin from fruit of different maturities and extraction methods. *Food Chemistry*, 166, 479-485.

Zhang, J., Liang, R., Wang, L., Yan, R., Hou, R., Gao, S., Yang, B. (2013). Effects of an aqueous extract of *Crataegus pinnatifida* Bge. Var. *major* N.E.Br. fruit on experimental atherosclerosis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 148, 563-569.

Zhang, W., Xu, P., Zhang, H. (2015). Pectin in cancer therapy: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 44, 258-271.

Zhao, J., Wei, T., Wei, Z., Yuan, F., Gao, Y. (2015). Influence of soybean soluble polysaccharides and beet pectin on the physicochemical properties of lactoferrin-coated orange oil emulsion. *Food Hydrocolloids*, 44, 443-452.

Zhu, R., Li, T., Dong, Y., Liu, Y., Li, S., Chen, G., Zhao, Z., Jia, Y. (2013). Pectin pentasaccharide from hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge. Var. *major*) ameliorates disorders of cholesterol metabolism in high-fat diet fed mice. *Food Research International*, 54, 262-268.

Zouambia, Y., Ettoumi, K.Y., Krea, M., Moulai-Mostefa, N. (2014). A new approach for pectin extraction: Electromagnetic induction heating. *Arabian Journal of Chemistry*, In press. doi:10.1016/j.arabjc.2014.11.011.

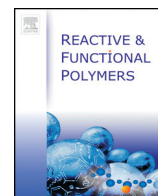
## 10. ANEXO

### Publicación

#### **Physicochemical characterisation of hawthorn pectins and their performing in stabilizing oil-in-water emulsions.**

J.C. Cuevas-Bernardino, C. Lobato-Calleros, A. Román-Guerrero, J. Alvarez-Ramirez, E.J. Vernon-Carter.

*Reactive and Functional Polymers*, 103, 63-71.



## Physicochemical characterisation of hawthorn pectins and their performing in stabilising oil-in-water emulsions



J.C. Cuevas-Bernardino<sup>a</sup>, C. Lobato-Calleros<sup>b</sup>, A. Román-Guerrero<sup>a</sup>, J. Alvarez-Ramirez<sup>c</sup>, E.J. Vernon-Carter<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Apartado Postal 55-534, Iztapalapa, 09340, México, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carr. México-Texcoco, Texcoco 56230, México, Mexico

<sup>c</sup> Área de Ingeniería Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Apartado Postal 55-534, Iztapalapa, 09340, México, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 7 August 2015

Received in revised form 23 February 2016

Accepted 31 March 2016

Available online 9 April 2016

#### Keywords:

Hawthorn pectins

Intrinsic viscosity

Adsorption dynamics

Emulsion stability

### ABSTRACT

The physicochemical characteristics, intrinsic viscosity, adsorption dynamics and emulsifying properties of two hawthorn accessions pectins (HP50 and HP55) were evaluated and compared to those obtained for commercial citrus pectin (CP). Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada coefficients,  $a_{MHKS} = 0.71 \pm 0.02$  and  $k_{MHKS} = 5.08 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-4} \text{ g dL}^{-1}$  were obtained from intrinsic viscosity data. The diffusion ( $K_{diff}$ ), penetration ( $K_1$ ) and the rearrangement ( $K_2$ ) constants were determined from adsorption dynamics data of the pectins at the canola oil-water interface.  $K_{diff}$  was higher and  $K_1$  was lower for HP50 than for HP55 and for CP. These results had bearing on the stability of oil-in-water emulsions. Higher  $K_{diff}$  produced smaller initial droplet sizes, due to the faster diffusion of molecules to the interface, while lower  $K_1$  produced longer-term stability, as a more consolidated and stronger interfacial film was formed faster, making arduous the penetration of newly arriving molecules through the monolayer. The rate of creaming was lower the smaller was the initial droplet size and the higher the apparent viscosity of the emulsions.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Pectin is used in a number of foods as a gelling agent, thickener, texturizer, emulsifier and stabilizer [1]. The backbone of pectin molecules is composed of poly- $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  4)-D-galacturonic acid with carboxyl groups in the methyl ester form [2]. Although pectin can be found in many plant tissues, its main commercial production is conventionally based on apple pomace and citrus peel [3]. New sources of pectin are recommendable to explore in order to seek new technological functionalities and for contributing to the social and economic development of local producers. Hawthorn (*Crataegus* spp.) is a genus of fruit-bearing trees or shrubs distributed in North America, East Asia, Central Asia, and Europe, belonging to the Rosaceae family, which contains high amounts of pectin [4,5]. In the last decades, more effort has been put into exploring the properties of pectins from different sources since the consumer demand for natural food ingredients and emulsifiers has increased. The functional properties of pectins depend on the molecular weight (MW), degree of esterification, acetyl-esterification, source, and extraction method [6,7]. Thus, for pinpointing their potential applications, it is necessary to characterise their physicochemical properties. To our knowledge, studies on hawthorn pectins have been limited to elucidating their partial structural features and viscosity of the cold-water extracts [4]; the viscoelastic and textural properties of gels [8];

the soluble protopectin and pectin levels from hawthorn fruits at different ripening stages [9]; and the extraction optimisation and some physicochemical properties [5]. However, there are no studies regarding the interfacial adsorption of hawthorn pectins at the oil-water interface, and their ability to stabilise oil-in-water emulsions. When pectins, independently of their source, are destined to be used in emulsion stabilisation, it must be established if they possess surface activity, the ability to produce small oil droplet sizes and stabilise them against flocculation, coalescence and gravitational separation [10]. The application of pectins as emulsifiers is limited due to scant knowledge about their surface-active-molecular features [11]. It has been reported that citrus peel and apple pomace pectins are not effective emulsifying agents irrespective of their degree of esterification (DE) [12]. Other authors have reported that beet and citrus pectin were capable of stabilising oil-in-water emulsions, and that the small amount of protein associated to pectin played a key role [13]. The proteinaceous material adsorbs at the oil-water interface, and the oil droplets are sterically stabilised by the hydrophilic polysaccharide moieties protruding into the aqueous phase [14]. Additionally, acetyl within the galacturonic backbone and phenolic esters in the side chains have been shown to cause additional anchoring at the interface [15]. Depolymerised citrus pectin, with the MW of 70,000 Da and 70% DE, was capable to produce stable fine rapeseed oil-in-water emulsions. Only a small pectin fraction (25%) became associated with the oil droplets, and this contained most of the protein fraction present in the polysaccharide [16]. As only a small fraction of the pectin molecules adsorb at the interface, the remaining pectin

\* Corresponding author.

E-mail address: [jvc@xanum.uam.mx](mailto:jvc@xanum.uam.mx) (E.J. Vernon-Carter).

molecules increase the continuous phase viscosity, and the tendency of the dispersed oil droplets to approach each other and coalesce is deterred [10]. Research about the interfacial characteristics of pectins, in our case of hawthorn pectins, in terms of molecular diffusion, penetration and configurational rearrangement of their adsorbed segments at oil-water interfaces and their relationship with their physicochemical properties may provide useful knowledge for the design of stable food grade emulsions. In this sense, it is important to compare the hawthorn pectin properties with those of commercial pectins such as citrus pectin, even when their physicochemical features are obviously different, in order to evaluate their commercial and technological potential [17]. In this regard, there are no systematic researches on the physicochemical characterisation of pectins from different hawthorn accessions and the relationship with emulsions stability.

The objectives of this work were to determine for two hawthorn pectin accessions the: (1) physicochemical properties and molecular weight; (2) rheological properties of aqueous solutions; (3) adsorption dynamics at the oil-water interface; (4) capability to form and stabilise oil-in-water emulsions; and (5) to compare the results with those obtained for a commercial citrus pectin.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Hawthorn fruits (*Crataegus* spp.) of the accessions 50 (HP50) and 55 (HP55) were obtained from the Hawthorn germplasm bank of the Universidad Autonoma Chapingo (Texcoco, State of Mexico, Mexico). Pectin from citrus peel (CP; P9135 product number) was purchased from Sigma-Aldrich Mexico (Toluca, State of Mexico, Mexico). Canola oil (Alimentos Capullo, Mexico City, Mexico) was purified with Florisil (60–100 mesh, product number 46385, Sigma-Aldrich Mexico) and used as the oil phase of the emulsions. All the reagents used were analytical grade. The water used for all the experiments was double distilled and deionised.

### 2.2. Pectin extraction and purification

The pectin was extracted as follows: 100 g of hawthorn fruit pulp (75.4% moisture) were blended with 1 L of citric acid (4% w/v). The extraction was carried out at 85 °C for 60 min in a shaking water bath. The resulting extract was cooled to room temperature (20 ± 2 °C) and filtered through a Whatman No. 1 filter paper using a Buchner funnel which was connected to a vacuum pump. The filtrate was added with 96% ethanol in a 1:1 volume ratio, kept for 24 h at 5 °C, to allow pectin precipitation and to reach the equilibrium state [18]. The pectin was then separated by filtration through a Whatman No. 1 filter paper and washed twice with 70% ethanol in a 1:1 volume ratio for eliminating impurities. The mixture was centrifuged at 3300 × g for 20 min at 20 °C using a Sorvall RC-5B centrifuge (GMI, Inc., Ramsay, MN, USA), and the supernatant was discarded. The pellet was dialysed in tubing having a pore size of 12,000 nominal MW cut-off (Spectra/Por 6 Dialysis Membrane, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA), against distilled water at 5 °C for 96 h, with changing of dialysing water twice a day [19]. The material remaining within the dialysis tubing was dried in an air-circulating oven (Memmert, Wisconsin Oven Distributors, Eagle, WI, USA) at 35 °C during 24 h. The dried pectin was ground with a pestle and mortar in order to obtain a fine powder. The fresh ( $Y_f$ ) and dry basis ( $Y$ ) pectin yields were calculated using Eqs. (1) and (2), respectively [18]:

$$Y_f(\%) = 100 \left( \frac{\text{weight of dried pectin (g)}}{\text{weight of fresh haw pulp (g)}} \right) \quad (1)$$

$$Y(\%) = 100 \frac{Y_f}{(100 - \text{moisture content of fresh haw pulp})} \quad (2)$$

### 2.3. Pectin physicochemical characterisation

#### 2.3.1. Analytical methods

The percentage of nitrogen in the pectin was determined by the Kjeldahl method using a Büchi system (Scrubber 412, Digestion unit 426 and Distillation unit K-314; Büchi Laborotechnik AG, Flawil, Switzerland). The protein content was calculated using a conversion factor of 6.25. The moisture content was estimated by heating at 105 °C until constant weight was achieved. Ash content was estimated by heating (muffle furnace) at 550 °C until constant weight was achieved [20]. Galacturonic acid content was determined by the sulfamate/3-phenylphenol colourimetric assay [21], using D-galacturonic acid as standard (Sigma-Aldrich Mexico, Toluca, State of Mexico, Mexico). Phenolic content was analysed using Folin-Ciocalteu's reagent [22] and gallic acid as the standard (Sigma-Aldrich Mexico, Toluca, State of Mexico, Mexico). The content of total phenolics was expressed in µg gallic acid equivalents (GAE)/mg pectin.

#### 2.3.2. Degree of esterification of the pectin

DE of the pectin was determined by a titrimetric method of Singthong et al. [23] with slight modifications. Pectin powder (500 mg) was moistened with 2 mL of ethanol and dissolved in 100 mL of carbon dioxide-free water. After the sample was completely dissolved, 5 drops of phenolphthalein were added, the sample was titrated with 0.5 M sodium hydroxide and the result was recorded as the initial titre. Then, 10 mL of 0.5 M sodium hydroxide were added, the sample was shaken vigorously, and allowed to stand for 15 min; 10 mL of 0.5 M hydrochloric acid were added and the sample was shaken until the pink colour disappeared. Phenolphthalein (5 drops) was added and the solution was titrated with 0.5 M sodium hydroxide to a faint pink colour that persisted after vigorous shaking (end-point). This volume of titration was recorded as the final titre. The DE was calculated from the following formula:

$$\%DE = \left[ \frac{\text{final titre}}{\text{initial titre} + \text{final titre}} \right] \times 100 \quad (3)$$

#### 2.3.3. Methoxyl percentage

The methoxyl percentage (MeO%) was determined according to Zouambia et al. [24]. Since the amount of methoxyl in 100% of esterified pectin is 16.32%, the methoxyl percentage was calculated from the following equation:

$$\text{MeO}\% = \frac{16.32}{100} \times DE \quad (4)$$

#### 2.3.4. Average molecular weight of pectin

The average molecular weight of pectin ( $MW_{GPC}$ ) was determined by gel permeation chromatography (GPC) procedure of Román-Guerreiro et al. [25] with slight modifications. Pectin solutions (20 mg mL<sup>-1</sup>, 0.15 M NaCl) were solubilised under magnetic stirring during 30 min at room temperature (20 ± 2 °C), let to stand for 24 h for achieving complete hydration, then filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore Co., Milford, NH, USA), and manually injected (5 mL) through a packed column with gel Sephacryl S-500-HR (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) with an inner diameter of 2.54 cm and 88.5 cm length, coupled to a low-pressure liquid chromatography system (Biologic LP, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). For eluent 0.15 M NaCl at a flow rate of 0.57 mL min<sup>-1</sup> was used. Elution was monitored by UV absorption at 280 nm. The calibration curve was made using the following standards: blue dextran (2000 kDa), bovine thyroglobulin (669 kDa), bovine γ-globulin (158 kDa), chicken ovalbumin (44 kDa), horse myoglobin (17 kDa) and vitamin B12 (1.35 kDa) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

### 2.3.5. Intrinsic viscosity and estimation of the molecular conformation

The intrinsic viscosity  $[\eta]$  determination was realised according to Burkus and Temelli [26] with minor changes. Stock solutions (0.1% w/v) were prepared by dispersing the pectin powder in deionised water (0, 25, 50, and 100 mM NaCl) under magnetic stirring during 30 min at room temperature until full dissolution, and were stored at 25 °C for 24 h in order to complete the hydration. Each stock solution was diluted in a range of pectin concentration (0.001–0.1 g/100 mL). Diluted samples were vigorously stirred on a vortex mixer and left to equilibrate at least 15 min prior to viscosity measurements. Viscosity was determined with a Physica MCR 301 Dynamic Shear Rheometer (Physica Messtechnik, Stuttgart, Germany) using the DG26.7 concentric cylinders geometry with double gap at 25 °C at a constant speed of 62.1 s<sup>-1</sup> (20 rpm). The relative ( $\eta_{rel}$ ), specific ( $\eta_{sp}$ ) and reduced ( $\eta_{red}$ ) viscosities were calculated from the following equations:

$$\eta_{rel} = \frac{\eta_{solution}}{\eta_{solvent}} \quad (5)$$

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 \quad (6)$$

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C} \quad (7)$$

where  $\eta_{solution}$  is the pectin solution viscosity,  $\eta_{solvent}$  is the viscosity of the solvent (0, 25, 50 and 100 mM NaCl solutions) and C is the pectin concentration. Intrinsic viscosity  $[\eta]$  was calculated by linearly extrapolating the reduced viscosity to zero concentration. The measured  $[\eta]$  and  $MW_{GPC}$  of the pectins were related through Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada (MHKS) equation [27]:

$$[\eta] = k_{MHKS} [MW_{GPC}]^{a_{MHKS}} \quad (8)$$

or

$$\ln[\eta] = \ln k_{MHKS} + a_{MHKS} \ln MW_{GPC} \quad (9)$$

where the  $k_{MHKS}$  and  $a_{MHKS}$  are empirical constants, depending on the temperature as well as the polymer-solvent system [28]. The  $k_{MHKS}$  and  $a_{MHKS}$  constants were determined by the intercept and slope of the double logarithmic plot of  $[\eta]$  vs.  $MW_{GPC}$  of the three pectins in order to obtain a more detailed picture of their hydrodynamic structure. The value of  $a_{MHKS}$  can be used as an estimation of gross macromolecular conformation and hence values of ~0 correspond to spheres, 0.5–0.8 to random coils, and up to 1.8 to rigid rods [27].

### 2.4. Flow behaviour of pectin solutions

The flow behaviour of the pectin solutions (1% w/w) was measured using the method described by Yuliarti et al. [29]. Apparent viscosity curves of pectin samples were obtained with the rheometer using concentric cylinders geometry at 25 °C and at shear rates between 1 and 1000 s<sup>-1</sup>.

### 2.5. Dynamic interfacial tension

The dynamic interfacial tension was determined using the method described by Tang and Shen [30] with slight modifications. Pectin solutions at 0.1, 0.5 and 1% w/w were filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore Co., Milford, NH, USA). The dynamic interfacial adsorption of pectin molecules at the oil-water interface was determined by monitoring the evolution of interfacial tension ( $\gamma$ ) with time ( $\theta$ ). An optical contact angle meter, OCA-20, with oscillating drop accessory ODG-20 (Dataphysics Instruments GmbH, Filderstadt, Germany) was used in a dynamic mode for measuring interfacial tension ( $\gamma$ ) at the oil-water interface at 25 °C. Each pectin solution was placed in the syringe and

then a drop was delivered into purified canola oil. The decrease in interfacial tension was monitored for 10,800 s (3.0 h).

## 2.6. Preparation and characterisation of emulsions

### 2.6.1. Emulsions preparation

Oil-in-water (O/W) emulsions were prepared according to the procedure of Kermani et al. [10] with minor changes. HP50, HP55 and CP aqueous solutions of 0.5, 1 and 1.5% (w/w) were prepared as described above, and their pH was adjusted to 3.5 by adding 1 M NaOH or 1 M HCl. The dispersed phase (10 g of canola oil) was added drop-wise with continuous agitation to aqueous dispersion (90 g of pectin solution) with the help of a high shear Ultra-Turrax T50 basic homogenizer (IKA Works, Inc., Wilmington, DE, USA) at a rotational speed of 6000 rpm during 3 min. The coarse O/W emulsions were passed through a high-pressure homogeniser (Microfluidizer M-110P, Microfluidics Corporation, Newton, MA, USA) at 100 MPa for three cycles. The resulting emulsions were coded as E<sub>x,y</sub>, where x = type of pectin (HP50, HP55, CP) used and y = pectin concentration (% w/w) used.

### 2.6.2. Shear viscosity measurements

Flow curves were determined with shear rate ramps from 10<sup>-3</sup> to 10<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> at 25 °C on 24 h aged O/W emulsions (3.7 mL) with the rheometer coupled to concentric cylinder geometry. The apparent shear viscosity at a fixed shear rate (50 s<sup>-1</sup>) was reported.

### 2.6.3. Determination of average droplet size

The mean surface-volume droplet size ( $d_{3,2}$ ) and the span to express the distribution width of the particle size distribution (PSD) were determined on the fresh emulsions and after 1, 7, 14 and 28 days of storage (4 ± 1 °C) with a Malvern particle size analyser series 2600 (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, UK). A relative refractive index of 1.104 (ratio of the refractive indices of oil and water phase) was used.

### 2.6.4. ζ-Potential

ζ-Potential of the emulsions was measured using an automated capillary electrophoresis device (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Emulsions samples were diluted in deionised water at a ratio of 1:50 (v/v) and then filled into the test cell and the ζ-potential was calculated by the instrument using the Smoluchowski model [31].

### 2.6.5. Stability to creaming

Creaming stability of the emulsions was evaluated according to the method described by Shimoni et al. [32], using the LUMisizer (LUM GmbH, Berlin, Germany), a novel instrument employing centrifugal sedimentation to accelerate the occurrence of instability phenomena such as sedimentation, flocculation or creaming. Each emulsion variation (0.4 mL) was subjected to a rotational speed of 2000 rpm, during 2 h at 25 °C. About 250 measurements were determined at time intervals of 30 s. Normalised transmission (%) versus position (mm) in the scale range (100 mm–130 mm) graphs were obtained, and the creaming velocity (% integrated transmission/h) obtained from the slope was provided by the equipment software [33].

## 2.7. Data analysis

Analyses were carried out in triplicates from 3 independent experiments carried out using a randomized experimental design. Data were subjected to Simple Classification Analysis of Variance and to Tukey's means comparison analysis. Significance was established at  $p \leq 0.05$ . Data analysis was done using the Statgraphics Centurion XVI software (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA, USA).



### 3. Results and discussion

#### 3.1. Physicochemical characteristics of pectins

Table 1 shows the physicochemical characteristics of the pectins studied. HP50 had a yield of 20.9% which was non-significantly different from that of HP55 (19.8%). The yields fall within the values (16.7–19.1%) reported by other authors for hawthorn pectins [4,5]. HP50 and HP55 showed non-significant differences between themselves regarding the degree of esterification (78.2% and 78.1%), galacturonic acid content (86.7% and 86.0%), and methoxyl content (12.7%), respectively, but were significantly higher than those shown by the CP. The three pectins had a galacturonic acid content higher than 65%, which is the lower limit required for pectins to be classified as commercial grade pectins [8]. Likewise, the three pectins can be considered as high methoxyl pectins with rapid setting time capability because DE was higher than the required 72% to be classified as such [10].

The average molecular weight, total phenols, and protein contents were significantly higher for HP50 (202,110 Da; 8.40  $\mu\text{g GAE mg}^{-1}$ ; 3.5%) than for HP55 (184,990 Da; 6.94  $\mu\text{g GAE mg}^{-1}$ ; 2.8%), than for CP (75,193 Da; 3.02  $\mu\text{g GAE mg}^{-1}$ ; 2.5%), respectively. A high methoxyl citrus pectin (73,000 Da; 2.8% protein content; DE of 70%) was used for stabilising oil-in-water emulsions [7]. Linares-García et al. [8] determined from intrinsic viscosity data that hawthorn pectin with 89.1% DE had a MW of 502,300 Da and a citrus pectin with 70.3% DE had MW of 95,100 Da. The relatively high protein contents found for HP50 and HP55 suggest they may possess relatively good emulsifying properties [10].

#### 3.2. Rheology of aqueous pectin solutions

##### 3.2.1. Intrinsic viscosity

The reduced viscosity-concentration behaviour of very dilute pectins aqueous solutions was studied in order to obtain their intrinsic viscosity. All macromolecular substances in solution enhance the viscosity of the solvent considerably, and the larger the molecular size (or weight), the larger the enhancement. This can be conveniently with the viscosity functions listed in Section 2.3.5. The reduced viscosity of a neutral macromolecule is dependent on the concentration, and extrapolation of the viscosity data to “zero” concentration yields the intrinsic viscosity, which measures the hydrodynamic volume per gram of macromolecular substance at infinite dilution. However, polyelectrolytes in water do not exhibit linear reduced viscosity curves over the concentration range that macromolecular substances are usually studied ( $\sim 1\%$  w/v or less). The reduced viscosity curve is a continuously increasing function with dilution, up to a point, due to the coil dimensions of polyelectrolytes are expanded by electrostatic repulsion between chain segments [34]. At extremely low concentrations ( $\sim 10^{-3}$ ) the reduced viscosity function decreases very rapidly with further dilution. A linear dependence

**Table 1**

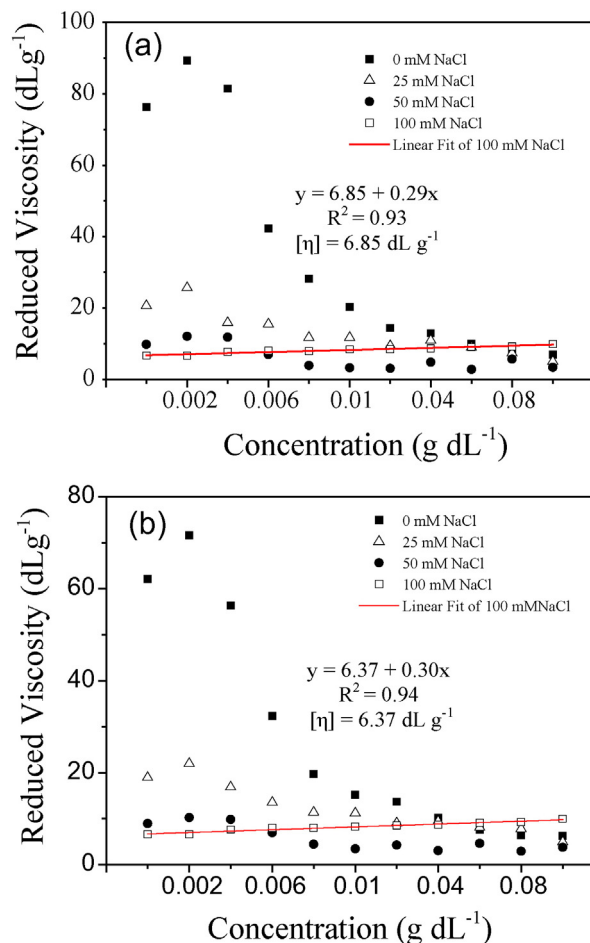
Yield and physicochemical characteristics of purified pectin extracted from hawthorn of two different accessions compared to citrus pectin.

|  | Pectin                      |                             |                             |
|--|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|  | CP                          | HP50                        | HP55                        |
| Yield (%)                              | n.a.                        | 20.9 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup> | 19.8 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup> |
| Moisture (%)                           | 7.1 $\pm$ 1.9 <sup>b</sup>  | 4.5 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>  | 7.1 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>  |
| Protein (%)                            | 2.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>  | 3.5 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>  | 2.8 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>  |
| Ash (%)                                | 0.8 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>  | 0.2 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>  | 0.2 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>  |
| Galacturonic acid (%)                  | 71.2 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup> | 86.7 $\pm$ 6.9 <sup>b</sup> | 86.0 $\pm$ 3.1 <sup>b</sup> |
| Total phenols ( $\mu\text{g GAE/mg}$ ) | 3.02 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup> | 8.40 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup> | 6.94 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup> |
| DE (%)                                 | 72.5 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup> | 78.2 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup> | 78.1 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup> |
| MeO (%)                                | 11.8 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup> | 12.7 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup> | 12.7 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup> |
| MW <sub>GPC</sub> (Da)                 | 75 193 <sup>a</sup>         | 202 110 <sup>c</sup>        | 184 990 <sup>b</sup>        |

Data are means  $\pm$  standard deviations. Different letters in the same row indicate significant difference between means ( $p \leq 0.05$ ). Not available (n.a.). Percentages are given in dry basis (d.b.). GPC = gel permeation chromatography.

of reduced viscosity on polyelectrolyte concentration may be obtained, if the diluted aqueous solvent contains an appropriate electrolyte concentration [35]. Fig. 1a and b shows the relationship of the reduced viscosity of HP50 and HP55 against concentration (c), using water and different NaCl concentration as solvent. As can be appreciated, a concentration of 100 mM NaCl ensured a linear relationship. Linearity between  $\eta_{\text{red}}$  versus c also occurred for CP when solvent contained 100 mM NaCl. The intrinsic viscosity values for HP50, HP55 and CP were 6.85, 6.37 and 3.37 dL g<sup>-1</sup>, respectively.

The double logarithmic plot of  $[\eta]$  versus  $MW_{\text{GPC}}$  data obtained for the three pectins (HP50, HP55 and CP), yielded a straight line ( $R^2 > 0.99$ ) with a slope ( $a_{\text{MHKS}}$ ) of  $0.71 \pm 0.02$  and an intercept ( $k_{\text{MHKS}}$ ) of  $5.08 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-4} \text{ g dL}^{-1}$ . From the value of  $a_{\text{MHKS}}$  it can be inferred that the conformation of pectin molecules was random coil [36]. The practical significance of determining the  $a_{\text{MHKS}}$  and  $k_{\text{MHKS}}$  for a particular system by measuring the intrinsic viscosity of biopolymers of known molecular weights is the ease with which unknown molecular weights of other biopolymers may be determined under the same conditions [28]. This point is crucial, as there are many studies in which biopolymers viscosity-molecular weight is determined using Eq. (9) with  $a_{\text{MHKS}}$  and  $k_{\text{MHKS}}$  coefficients obtained from  $[\eta]$  measurements performed under different conditions (i.e. polymer-solvent, ionic strength, temperature, etc.), so that the reported molecular weights can be only an estimate [2,37,38]. The Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada coefficients determined in this work can be used for determining the viscosity-molecular weight of pectins from other botanical



**Fig. 1.** Reduced viscosity versus concentration of the (a) HP50 and (b) HP55 pectins. The solid line shows a linear relationship between reduced viscosity and pectin concentration at 100 mM NaCl. The resulting linear equation and intrinsic viscosity value are given.

sources or of other hawthorn pectin accessions, if the system conditions are maintained (25 °C, 100 mM NaCl solution as solvent).

### 3.2.2. Flow behavior of pectin solutions

The apparent viscosity ( $\eta$ )-shear rate ( $\dot{\gamma}$ ) curves of 1% w/w pectin solutions (pH 3.5) are depicted in Fig. 2. In all cases, a non-Newtonian shear thinning behavior was found, that is in agreement with the behaviour reported for pectin solutions from different botanical origins [39,40]. At any given shear rate, HP50 exhibited higher  $\eta$  than HP55 and CP, even at other pectin concentrations (data not shown). Thus, it seems that the viscosity behaviour of the pectin solutions studied kept a close relationship with the  $MW_{GPC}$  and DE. Higher  $MW_{GPC}$  and DE in hawthorn pectins tended to produce solutions with higher apparent viscosity at all shear rates. Several authors have pointed out that the apparent viscosity of pectin solutions depends on the molar mass [41], stiffness and charge of the molecules [42], degree of esterification [38], the presence of acetyl groups [42] and side branches [43], among other factors.

### 3.3. Dynamics of adsorption

The decrease of the interfacial tension with the time at the canola oil-water interface as a function of pectin type and concentration showed similar profiles as can be seen in Fig. 3. The interfacial tension at the bare canola oil-water interface was  $29 \text{ mNm}^{-1}$ . The initial drop in interfacial tension was substantial during the first seconds for all the pectins, independently of concentration. This implies that the supply of pectin molecules to the interface by diffusion was sufficiently high that a monolayer was formed after a few minutes, probably due to adsorption of the protein and polyphenol rich fractions, and methylated carboxyl groups present in these polysaccharides [7,15] (Table 1). The higher the pectin concentration, the more pronounced was the initial drop in the interfacial tension. The slow progressive drop in interfacial tension at longer times should be caused by the reformation of adsorbed pectin molecules at the interface. When the supply of molecules by diffusion is sufficiently high, the molecules arriving at the interface compete for interfacial sites. Under these conditions, the pectin molecules will not adsorb in their most advantageous form, as they will not have room to unfold, and the major part of each molecule will project into the continuous phase. The reformation of pectin molecules at the interface should be a quite slow process [44]. HP50, despite having the highest molecular weight, produced the largest interfacial tension decrease, independently of concentration, at any given time, than HP55 and CP. One would expect that higher molecular weight pectins would diffuse more slowly than low molecular weight pectins.

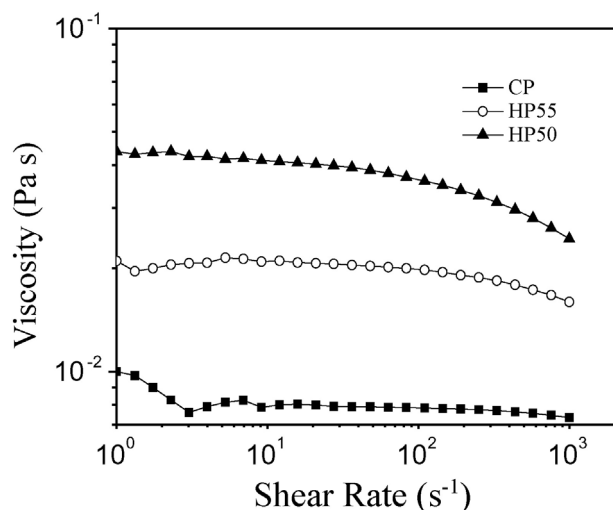


Fig. 2. Flow curves of pectin solutions (1% w/w) at pH 3.5 and 25 °C.

However, higher protein, methoxyl and total phenol contents in HP50, could act as the driving force for speeding up diffusion and anchoring at the interface. From this point of view, a proper balance between molecular weight and moieties contributing to greater hydrophobicity of the pectin molecules could prove crucial features for enhancing the adsorption kinetics of these molecules at the interface. Thus, HP50 presented a better balance between  $MW_{GPC}$  and hydrophobicity than HP55 and CP.

The time evolution of the surface pressure ( $\pi$ ) (figures not shown) for the three pectins at the different concentrations was derived from

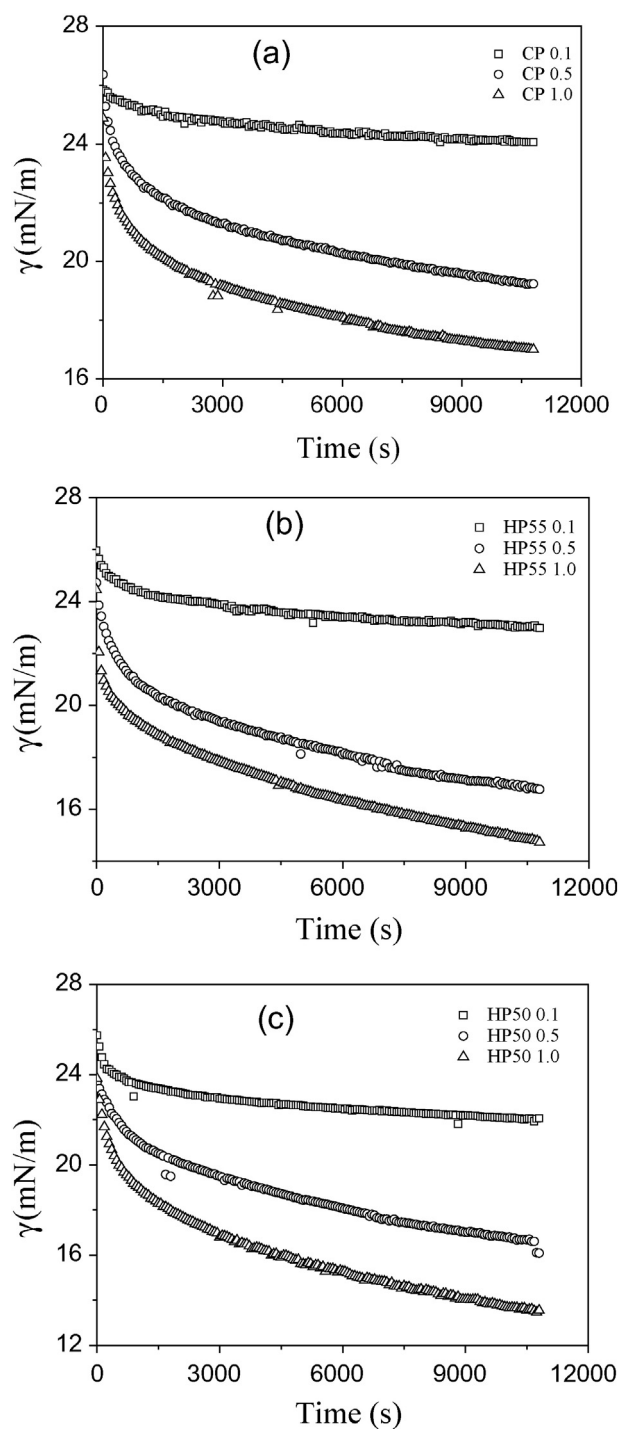


Fig. 3. Time evolution of interfacial tension ( $\gamma$ ) for pectin adsorption at pH 3.5 as a function of concentration (0.1, 0.5, and 1% w/w) at the oil-water interface: (a) CP; (b) HP55; and (c) HP50.



the data of Fig. 3. In all cases  $\pi$  progressively increased with adsorption time and with increasing pectin concentration, independently of pectin type. The surface pressure build-up with time was higher for HP50 than for HP55 and CP. The surface pressure-time curves profile indicate that pectin adsorption kinetics involve several mechanisms that may include: (i) diffusion of pectin from the bulk to the interface, (ii) adsorption (penetration) at the interface and interfacial unfolding, (iii) rearrangement of molecules at the interface, multilayer formation and possible interfacial gelation [45]. At relatively low surface pressures, the diffusion rate is the controlling step, and a modified form of the Ward and Tordai [46] equation can be used for correlating the change in surface pressure with time:

$$\pi = 2C_0KT \left( \frac{D\theta}{3.14} \right)^{1/2} \quad (10)$$

where  $C_0$  is the initial pectin concentration in the aqueous phase,  $K$  is the Boltzmann constant,  $T$  is the absolute temperature,  $D$  is the diffusion coefficient, and  $\theta$  is the time. A plot of  $\pi$  versus  $\theta^{1/2}$  will be linear and the slope of this plot will be the diffusion rate ( $K_{diff}$ ) [45,46].

The square root of time dependence of  $\pi$  for HP50, HP55 and CP at a concentration of 0.1% w/w at the canola oil-water interface is shown in Fig. 4. The  $\pi$ - $\theta^{1/2}$  curves for other 0.5 and 1% w/w concentrations showed similar profiles, differing only in that the initial slope of the curves, that defines  $K_{diff}$  was more pronounced and occurred at shorter times as concentration increased. It can be observed from the slope change of the curves of Fig. 4 that the diffusion-controlled adsorption at any concentration occurred within 780 s independently of the type of pectin used. The values of  $K_{diff}$  for the three pectins at different concentrations are given in Table 2, and were at any given pectin concentration from lower to higher as follows: CP < HP55 < HP50. These results seem to indicate that the hydrophobic character of the pectins controlled the diffusion-adsorption phenomenon. These rate limiting mechanisms of the adsorbed pectin molecules at the interface can be monitored by using the following first-order phenomenological equation [30]:

$$\ln[(\pi_{10800} - \pi_\theta)/(\pi_{10800} - \pi_0)] = -k_i\theta \quad (11)$$

where  $\pi_{10800}$ ,  $\pi_\theta$  and  $\pi_0$  are the surface pressures at the experimental final adsorption time (10,800 s), at any time ( $\theta$ ), and at the initial time (780 s in this case), respectively, and  $k_i$  is the first-order rate constant. A plot of  $\ln[(\pi_{10800} - \pi_\theta)/(\pi_{10800} - \pi_0)]$  versus  $\theta$ , where the short diffusion-controlled time (<780 s) period is deleted from the analysis

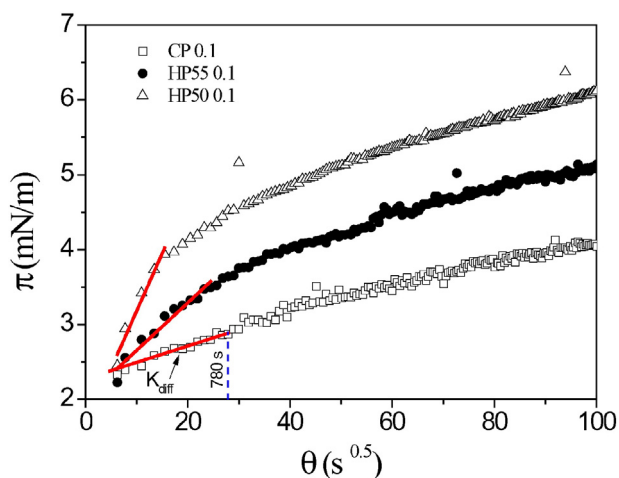


Fig. 4. The square root of time ( $\theta^{1/2}$ ) dependence of surface pressure ( $\pi$ ) for adsorbed pectins at pH 3.5 at the oil-water interface, at a concentration of 0.1% w/w. The solid line depicts the linear slope of the curves where adsorption is diffusion-controlled.

Table 2  
Dynamic parameters of adsorption of pectins at the oil-water interface.

| Pectin               | $K_{diff}$<br>( $\text{mNm}^{-1} \text{s}^{-0.5}$ ) | $K_1 \times 10^4$<br>( $\text{s}^{-1}$ ) | $K_2 \times 10^4$<br>( $\text{s}^{-1}$ ) |
|----------------------|---|--|--|
| CP <sub>0.10</sub>   | 0.023 ± 0.00  | 2.59 ± 0.01                              | 6.30 ± 0.38                              |
| CP <sub>0.50</sub>   | 0.105 ± 0.00  | 2.57 ± 0.01                              | 9.42 ± 0.00                              |
| CP <sub>1.0</sub>    | 0.123 ± 0.04  | 2.45 ± 0.02                              | 15.4 ± 0.01                              |
| HP55 <sub>0.10</sub> | 0.047 ± 0.01  | 2.60 ± 0.02                              | 6.75 ± 0.09                              |
| HP55 <sub>0.50</sub> | 0.110 ± 0.06  | 2.43 ± 0.02                              | 11.4 ± 0.00                              |
| HP55 <sub>1.0</sub>  | 0.129 ± 0.01  | 2.36 ± 0.00                              | 16.5 ± 0.01                              |
| HP50 <sub>0.10</sub> | 0.072 ± 0.00  | 0.078 ± 0.004                            |  |
| HP50 <sub>0.50</sub> | 0.113 ± 0.00  | 0.076 ± 0.001                            |  |
| HP50 <sub>1.0</sub>  | 0.193 ± 0.00  | 0.073 ± 0.001                            |  |

Data are means ± standard deviations. Different letters in the same row indicate significant difference between means ( $p \leq 0.05$ ).

for the sake of convenience, can yield two or more linear regions. Fig. 5 shows that while HP50 at 0.1% w/w showed only one slope, HP55 and CP at the same concentration showed two slopes. The first slope is associated to an energy barrier that hinders the penetration and unfolding of the pectin molecules at the interface, and is known as the constant of penetration ( $K_1$ ), while the second slope, is associated to the molecular reformation of the molecules at the interface and is termed as the constant of structural or molecular rearrangement ( $K_2$ ) [30,45]. At pectin concentrations of 0.5 and 1% w/w, the three pectins showed a similar behaviour as at 0.1% w/w (figures not shown). The values of the  $K_1$  and  $K_2$  constants for HP50, HP55 and CP as a function of concentration are shown in Table 2. The relevance of these constants can be more clearly appreciated in the following sub-section in relation to emulsion stability.

#### 3.4. Emulsions droplet size and apparent viscosity

Fig. 6 shows the evolution in droplet size of the oil-in-water emulsions prepared using HP50, HP55 and CP as emulsifying agents in concentrations of 0.5, 1 and 1.5% w/w during 28 days at 4 °C. Significant differences were observed on the initial droplet size of the emulsions depending on the pectin type and concentration. In all cases, the initial droplet size was larger when the pectin concentration was lower. At a pectin concentration of 0.5% w/w, the initial droplet size of the emulsions varied as follows:  $E_{CP,0.5}$  ( $5.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ) >  $E_{HP55,0.5}$  ( $2.0 \pm 0.1 \mu\text{m}$ ) >  $E_{HP50,0.5}$  ( $1.6 \pm 0.1 \mu\text{m}$ ). As pectin concentration increased to 1 and 1.5% w/w the initial droplet size decreased significantly with respect to the sizes occurring at 0.5% w/w. A higher emulsifier concentration is required in order to form smaller droplets with higher surface

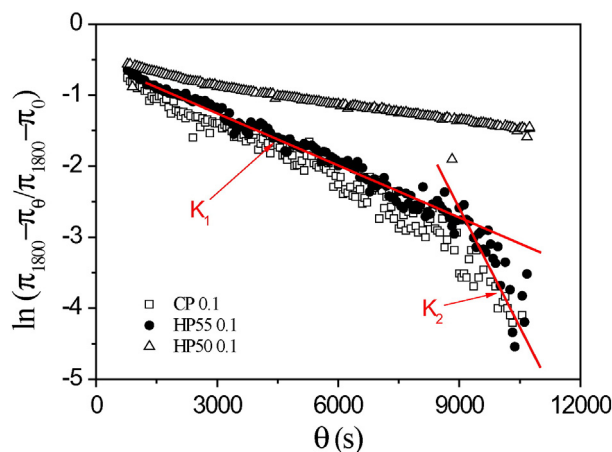
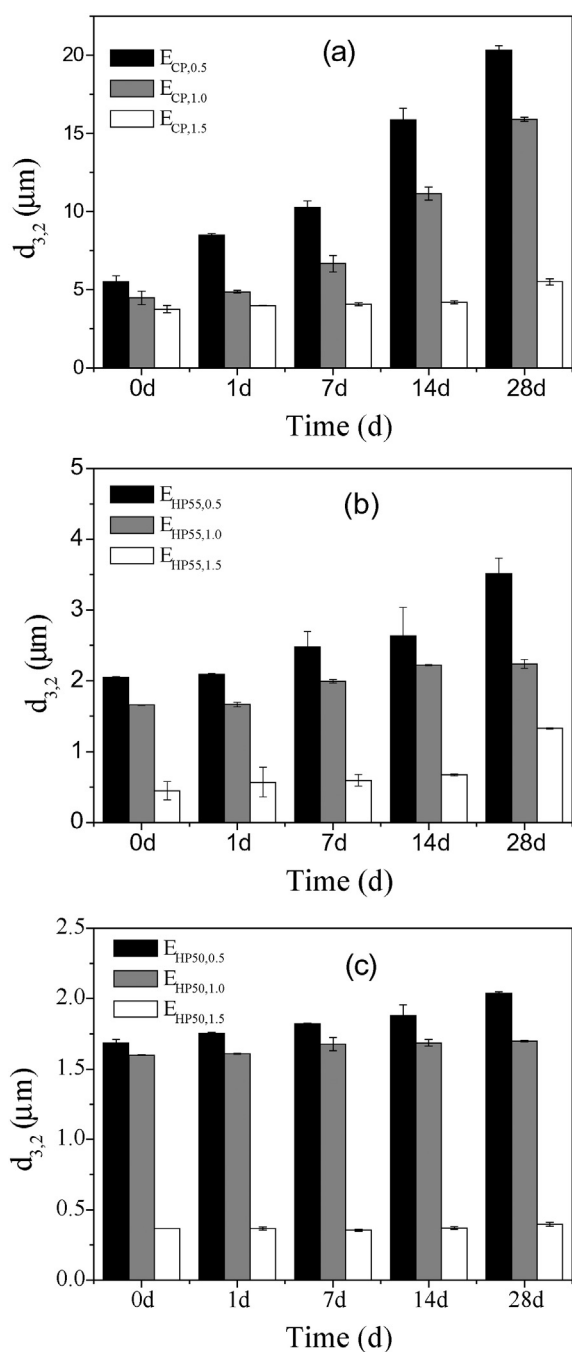


Fig. 5. Plot of  $\ln(\pi_{1800} - \pi_\theta / \pi_{1800} - \pi_0)$  against the time ( $\theta$ ) for the adsorbed pectins at pH 3.5 at the oil-water interface, at a concentration of 0.1% (w/w). The solid lines depict the first slope representing the penetration ( $K_1$ ) and the second slope structural rearrangement ( $K_2$ ) coefficients, respectively.



**Fig. 6.** Mean droplet size variation of the emulsions over 28 days of storage at 4 °C: (a)  $E_{CP}$ ; (b)  $E_{HP55}$ ; and (c)  $E_{HP50}$ .

area, since the amount of emulsifier available to form a monolayer adsorbed on the surface of the emulsion droplets controls the interfacial surface area produced [47]. Several authors have reported the formation of oil-in-water emulsions stabilised with mango peel, apple pomace, sugar beet and citrus pectins (concentrations ranging from 0.3–1.2% w/w) with average droplet sizes ranging in between 1 and 50  $\mu\text{m}$  [7, 10].  $E_{HP50}$  exhibited the smallest oil droplets at all the pectin concentrations. Macromolecules that are effective in stabilising emulsions should be able to promote emulsion formation and short term stabilisation by interfacial action, and to confer long term droplet stability forming adsorption layers providing a steric repulsion mechanism [12]. The data of Fig. 3 indicate that the three pectins had the ability to decrease the interfacial tension, so they possessed emulsifying capacity, which is directly related to the amount of emulsifier adsorbed onto the surface

of the droplets per unit volume of emulsion [48]. During the initial stages of homogenisation the bulk oil phase is broken into tiny droplets which intermingle with the aqueous phase. The quicker the emulsifier molecules reach and cover the droplets surface, the smaller will result the initial droplet size and the greater the emulsifying capacity.  $K_{diff}$  was significantly higher for HP50, than for HP55 and CP, meaning that its molecules diffused and anchored more rapidly at the interface, forming smaller initial droplet sizes [49]. Once small droplets have been successfully prepared, considerations of surface activity or interfacial tension gradients are no longer relevant [12]. What matters for subsequent long-term stability is how the adsorbed polymer molecules conform around the oil droplets, i.e., if they are able to form thick steric stabilising layer and/or charged stabilising layer. To this end,  $K_1$  and  $K_2$  can provide important insights. As can be seen from Table 2,  $K_1$  for HP50 was significantly lower than for HP55 and for CP at all concentrations. In practice this means that newly arriving HP50 molecules found relatively difficult to penetrate the existing adsorbed monolayer, and this is indicative that the adsorbed HP50 layer formed around the droplets was robust. In contrast, HP55 and CP molecules could penetrate relatively more easily the monolayer around the droplet surface. Furthermore, HP50 did not exhibit a second slope, indicative that the HP50 molecules packing at the interface did not allow much freedom for molecules rearrangements, while HP55 and CP did show a second slope at all concentrations, indicative that there was place for substantial pectin molecules rearrangement, due to a relatively lower interface packing than in the case of HP50. This was reflected on the stability of the emulsions over time. The droplet increase of the  $E_{HP50}$  emulsions at any pectin concentration was significantly lower than that incurred by the  $E_{HP55}$  and  $E_{CP}$  emulsions (Fig. 6). Furthermore, the span values of the emulsions varied from 4.48–2.88 for  $E_{CP}$  > 4.03–1.82 for  $E_{HP55}$  > 3.71–1.69 for  $E_{HP50}$  for pectin concentrations ranging between 0.5 and 1.5% w/w. This result indicates that the higher the pectin concentration, independently of pectin type, the lower was the disproportion between droplet sizes, and the higher the emulsions stability. This is confirmed by the creaming velocity (% integrated transmission/h) of the emulsions (Table 3).

The creaming velocity was affected by the pectin type and by the pectin concentration used for stabilising the emulsions. As pectin concentration was increased, the creaming velocity decreased in all cases. Creaming velocity kept a close interrelationship with the droplet size, span and with the apparent viscosity of the emulsions (Fig. 7). Thus, the smaller was the initial droplet size and the higher the apparent viscosity of the emulsion, the lower was the creaming velocity of the emulsions (Table 3). Many authors have reported that a higher concentration of smaller sized droplets leads to an enhanced formation of a three-dimensional network, which combined with a high emulsion apparent viscosity prevented the coalescence and creaming phenomena by decreasing the droplet mobility [50–52]. Finally, despite that all the  $\xi$ -potential values of the emulsions droplets were relatively high (>–28 mV) in all cases (Table 3), it had little bearing on the improvement of the emulsions stability, as the steric stabilisation term

**Table 3**  
Zeta potential and creaming velocity of the emulsions.

| Emulsioncode    | Zeta potential (mV) | Creaming velocity (%) |
|-----------------|---------------------|-----------------------|
| $E_{CP, 0.5}$   | $-48.60 \pm 0.56^a$ | $25.89 \pm 0.64^a$    |
| $E_{CP, 1.0}$   | $-43.80 \pm 0.60^b$ | $12.11 \pm 0.08^b$    |
| $E_{CP, 1.5}$   | $-40.06 \pm 0.49^c$ | $3.22 \pm 0.04^e$     |
| $E_{HP55, 0.5}$ | $-35.68 \pm 0.27^d$ | $10.86 \pm 0.68^c$    |
| $E_{HP55, 1.0}$ | $-32.16 \pm 0.33^f$ | $2.70 \pm 0.05^f$     |
| $E_{HP55, 1.5}$ | $-30.51 \pm 0.50^g$ | $1.09 \pm 0.20^g$     |
| $E_{HP50, 0.5}$ | $-32.42 \pm 0.42^f$ | $4.99 \pm 0.59^d$     |
| $E_{HP50, 1.0}$ | $-33.76 \pm 0.20^e$ | $2.55 \pm 0.20^f$     |
| $E_{HP50, 1.5}$ | $-28.70 \pm 0.25^h$ | $0.49 \pm 0.04^h$     |

Data are means  $\pm$  standard deviations. Different letters in the same row indicate significant difference between means ( $p \leq 0.05$ ).

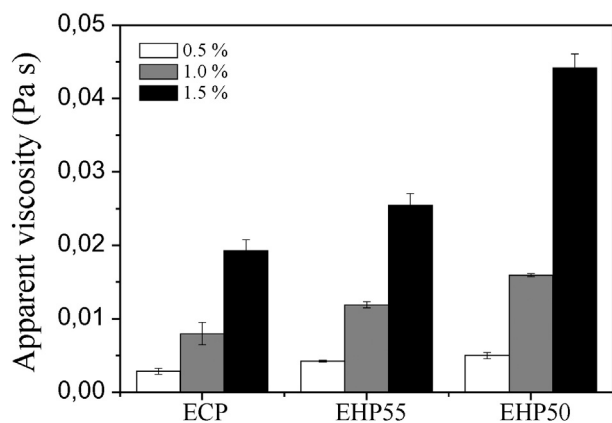


Fig. 7. Apparent viscosity of the oil-in-water emulsions with 0.5, 1 and 1.5% w/w hawthorn and citrus pectin at a fixed shear rate of 50 s<sup>-1</sup>.

combined with the emulsions apparent viscosity were the dominant stabilising mechanisms.

#### 4. Conclusions

The adsorption kinetic studies and the oil-in-water emulsions stability results indicated that the high methoxyl hawthorn pectins can be considered efficient emulsifying and stabilising agents when used on their own, as a result of possessing an adequate balance between high molecular weight and hydrophobic contributing moieties. This is significant, as it is well documented that pectins from citrus peel and apple pomace do not exhibit good emulsifying and stabilising properties. Another important contribution of this work was the determination of the Houwink-Mark-Kuhn-Sakurada coefficients for determining the viscosity-average molecular weight of pectins from simple intrinsic viscosity measurements. Despite that these constants depend on the temperature as well as the polymer-solvent system, the indiscriminate use of constants that were obtained for other polymers of different structure, using different solvent and temperature conditions are common in the scientific literature.

#### Acknowledgement

The authors extend their thanks to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for partially financing this work through project 236500.

#### References

- G. Mesbahi, J. Jamalain, A. Farahnaky, A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in food systems, *Food Hydrocoll.* 19 (2005) 731–738.
- Y. Jiang, Y. Du, X. Zhu, H. Xiong, M.W. Woo, J. Hu, Physicochemical and comparative properties of pectins extracted from *Akebia trifoliata* var. *australis* peel, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 1663–1669.
- W.G.T. Willats, J.P. Knox, J.D. Mikkelsen, Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel, *Trends Food Sci. Technol.* 17 (2006) 97–104.
- T. Li, S. Li, N. Wang, J. Liu, Physicochemical properties and partial structural features of haw pectin, *Eur. Food Res. Technol.* 227 (2008) 1035–1041.
- S.Y. Uysal, E. Yildirim, Extraction and characterisation of pectin from red hawthorn (*Crataegus* spp.) using citric acid and lemon juice, *Asian J. Chem.* 26 (2014) 6674–6678.
- F. Munarin, M.C. Tanzi, P. Petrini, Advances in biomedical applications of pectin gels, *Int. J. Biol. Macromol.* 51 (2012) 681–689.
- U.S. Schmidt, K. Schmidt, T. Kurz, H.U. Endreß, H.P. Schuchmann, Pectins of different origin and their performance in forming and stabilizing oil-in-water-emulsions, *Food Hydrocoll.* 46 (2015) 59–66.
- J.A. Linares-García, E.G. Ramos-Ramírez, J.A. Salazar-Montoya, Viscoelastic properties and textural characterisation of high methoxyl pectin of hawthorn (*Crataegus pubescens*) in a gelling system, *Int. J. Food Sci. Technol.* 50 (2015) 1414–1493.
- W.Q. Li, Q.P. Hu, J.G. Xu, Changes in physicochemical characteristics and free amino acids of hawthorn (*Crataegus pinnatifida*) fruits during maturation, *Food Chem.* 175 (2015) 50–56.

- Z.J. Kermani, A. Shpigelman, H.T.T. Pham, A.M. Van Loey, M.E. Hendrickx, Functional properties of citric acid extracted mango peel pectin as related to its chemical structure, *Food Hydrocoll.* 44 (2015) 424–434.
- A.A. Perez, C.C. Sánchez, J.M. Rodríguez Patino, A.C. Rubiolo, L.G. Santiago, Surface adsorption behaviour of milk whey protein and pectin mixtures under conditions of air–water interface saturation, *Colloids Surf., B* 85 (2011) 306–315.
- E. Dickinson, Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems, *Food Hydrocoll.* 17 (2003) 25–39.
- J. Leroux, G. Langendorff, G. Schick, V. Vaishnav, J. Mazoyer, Emulsion stabilizing properties of pectin, *Food Hydrocoll.* 17 (2003) 455–462.
- I. Gülseren, M. Corredig, Interactions between polyglycerol polyricinoleate (PGPR) and pectins at the oil-water interface and their influence on the stability of water-in-oil-emulsions, *Food Hydrocoll.* 34 (2014) 154–160.
- E.N. Fissore, A.M. Rojas, L.N. Gerschenson, P.A. Williams, Butternut and beetroot pectins: characterization and functional properties, *Food Hydrocoll.* 31 (2013) 172–182.
- M. Akhtar, E. Dickinson, J. Mazoyer, V. Langendorff, Emulsion stabilizing properties of depolymerized pectin, *Food Hydrocoll.* 16 (2002) 249–256.
- F. Rubio-Senent, G. Rodríguez-Gutiérrez, A. Lama-Muñoz, A. García, J. Fernández-Bolaños, Novel pectin present in new olive mill wastewater with similar emulsifying and better biological properties than citrus pectin, *Food Hydrocoll.* 50 (2015) 237–246.
- K. Muhammad, N.I.M. Zahari, S.P. Gannasin, N.M. Adzahan, J. Bakar, High methoxyl pectin from dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peel, *Food Hydrocoll.* 42 (2014) 289–297.
- B.M. Yap, Pectin quantity, composition and physicochemical behaviour as influenced by the purification process, *Food Res. Int.* 42 (2009) 1197–1202.
- AOAC, Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, 1995.
- T.M.C.C. Filisetti-Cozzi, N. Carpita, Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars, *Anal. Biochem.* 197 (1991) 157–162.
- V.L. Singleton, A. Rossi, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Am. J. Enol. Vitic.* 16 (1965) 144–158.
- J. Singthong, S.W. Cui, S. Ningsanond, H.D. Goff, Structural characterization, degree of esterification and some gelling properties of Krueo Ma Noy (*Cissampelos pareira*) pectin, *Carbohydr. Polym.* 58 (2004) 391–400.
- Y. Zouambia, K.Y. Ettoumi, M. Krea, N. Moulai-Mostefa, A New Approach for Pectin Extraction: Electromagnetic Induction Heating, *Arab. J. Chem.* 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabj.2014.11.011> (in press).
- A. Román-Guerrero, J. Orozco-Villafuente, J.P. Pérez-Orozco, F. Cruz-Sosa, R. Jiménez-Alvarado, E.J. Vernon-Carter, Application and evaluation of mesquite gum and its fractions as interfacial film formers and emulsifiers of orange peel-oil, *Food Hydrocoll.* 23 (2009) 708–713.
- Z. Burkus, F. Temelli, Determination of the molecular weight of barley β-glucan using intrinsic viscosity measurements, *Carbohydr. Polym.* 54 (2003) 51–57.
- G.A. Morris, G.G. Adams, S.E. Harding, On hydrodynamic methods for the analysis of the sizes and shapes of polysaccharides in dilute solution: a short review, *Food Hydrocoll.* 42 (2014) 318–334.
- P.C. Hiemenz, R. Rajagopalan, Principles of Colloid and Surface Chemistry, third ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 1997.
- O. Yulianti, L. Matia-Merino, K.K.T. Goth, J. Mawson, M.A.K. Williams, C. Brennan, Characterization of gold kiwifruit pectin from fruit of different maturities and extraction methods, *Food Chem.* 166 (2015) 479–485.
- C.H. Tang, L. Shen, Dynamic adsorption and dilatational properties of BSA at oil/water interface: role of conformational flexibility, *Food Hydrocoll.* 43 (2015) 388–399.
- K. Burapapadh, M. Kumpugdee-Vollrath, D. Chantasatrad, P. Sriamornsaka, Fabrication of pectin-based nanoemulsions loaded with itraconazole for pharmaceutical application, *Carbohydr. Polym.* 82 (2010) 384–393.
- G. Shimon, C. Shani Levi, S. Levi Tal, U. Lesmes, Emulsions stabilization by lactoferrin nano-particles under in vitro digestion conditions, *Food Hydrocoll.* 33 (2013) 264–272.
- J. Zhao, T. Wei, Z. Wei, F. Yuan, Y. Gao, Influence of soybean soluble polysaccharides and beet pectin on the physicochemical properties of lactoferrin-coated orange oil emulsion, *Food Hydrocoll.* 44 (2015) 443–452.
- F. Behrouzian, S.M.A. Razavi, H. Karazhiyan, Intrinsic of cress (*Lepidium sativum*) seed gum: effect of salts and sugars, *Food Hydrocoll.* 35 (2014) 100–105.
- W.M. Pasika, Polysaccharide polyelectrolytes, in: P.A. Sanford, A. Laskin (Eds.), *Extracellular Microbial Polysaccharides*, ACS Symp. Ser. 45, Washington, D.C. 1977, pp. 128–143.
- R.H. Chen, W.Y. Chen, S.T. Wang, C.H. Hsu, M.L. Tsai, Changes in the Mark-Houwink hydrodynamic volume of chitosan molecules in solutions of different organic acids, at different temperatures and ionic strengths, *Carbohydr. Polym.* 78 (2009) 902–907.
- M.T. Iglesias, J.E. Lozano, Extraction and characterization of sunflower pectin, *J. Food Eng.* 62 (2004) 215–223.
- M. Migliori, D. Gabriele, A. Checchetti, B. Battipede, Compatibility analysis of pectin at different esterification degree from intrinsic viscosity data of diluted ternary solutions, *React. Funct. Polym.* 70 (2010) 863–867.
- B. Min, J. Lim, S. Ko, K.G. Lee, S.H. Lee, S. Lee, Environmentally friendly preparation of pectins from agricultural byproducts and their structural/rheological characterization, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 3855–3860.
- L.C. Vriesmann, R.D.M.C. Amboni, C.L.O. Petkowicz, Cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.): composition and hot-water-soluble pectins, *Ind. Crop. Prod.* 34 (2011) 1173–1181.
- P.A. Williams, G.O. Phillips, Introduction to food hydrocolloids, in: P.A. Williams, G.O. Phillips (Eds.), *Handbook of Hydrocolloids*, CRC Press, USA 2000, pp. 1–19.
- N. Sengkhamparn, L.M.C. Sargis, R. de Vries, H.A. Schols, T. Sajjaanatakul, A.G.J. Voragen, Physicochemical properties of pectins from okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench), *Food Hydrocoll.* 24 (2010) 35–41.

- [43] J. Hwang, J.L. Kokini, Contribution of the side branches to rheological properties of pectins, *Carbohydr. Polym.* 19 (1992) 41–50.
- [44] E.J. Vernon-Carter, P. Sherman, Rheological properties and applications of mesquite tree (*Prosopis juliflora*) gum. 3. The influence of mesquite gum on the interfacial tension between oil and water, *J. Dispers. Sci. Technol.* 2 (1981) 381–396.
- [45] N.A. Camino, C. Carrera Sánchez, J.M. Rodríguez Patino, A.M.R. Pilosof, Hydroxypropylmethylcellulose at the oil-water interface. Part I. Bulk behavior and dynamic adsorption as affected by pH, *Food Hydrocoll.* 25 (2011) 1–11.
- [46] A.F.H. Ward, L. Tordai, Time dependence of boundary tensions of solutions, *J. Chem. Phys.* 14 (1946) 353–361.
- [47] Y. Yuan, Y. Gao, J. Zhao, L. Mao, Characterization and stability evaluation of  $\beta$ -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions, *Food Res. Int.* 41 (2008) 61–68.
- [48] R.H. Liang, L.H. Wang, J. Chen, W. Liu, C.M. Liu, Alkylated pectin: synthesis, characterization, viscosity and emulsifying properties, *Food Hydrocoll.* 50 (2015) 65–73.
- [49] D.J. McClements, *Food emulsions: Principles, Practices, and Techniques*, second ed. CRC Press, USA, 2005.
- [50] E. Dickinson, Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilisers, *Food Hydrocoll.* 23 (2009) 1473–1482.
- [51] E. García-Márquez, A. Román-Guerrero, F. Cruz-Sosa, C. Lobato-Calleros, J. Alvarez-Ramirez, E.J. Vernon-Carter, H. Espinosa-Andrews, Effect of layer (calcium phosphate-chitosan)-by-layer (mesquite gum) matrix on carotenoids-in-water-emulsion properties, *Food Hydrocoll.* 43 (2015) 451–458.
- [52] S. Aben, C. Holtze, T. Tadros, P. Schurtenberger, Rheological investigations on the creaming of depletion-flocculated emulsions, *Langmuir* 28 (2012) 7967–7975.